



Université de La Rochelle
Ecole doctorale Gay Lussac



Ifremer

Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE)

Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M)

Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM, La Tremblade)



THESE présentée par :

Pierrick MOREAU



Soutenue publiquement le 30 Octobre 2014

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Étude des interactions entre infection à ostreid herpes 1, immunité, autophagie et pesticides chez l'Huître creuse, *Crassostrea gigas*

Jury :

Mathias Faure
Laure Giambérini
Catherine Dupuy-Papin
Paco Bustamante
Béatrice Gagnaire
Tristan Renault
Thierry Burgeot

(Université de Lyon I)
(Université de Lorraine)
(Université de Tours)
(Université de La Rochelle)
(IRSN, Saint-Paul-lez-Durance)
(Ifremer, La Tremblade)
(Ifremer, Nantes)

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse



Université de La Rochelle
Ecole doctorale Gay Lussac



Ifremer

Département Ressources Biologiques et Environnement (RBE)

Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques (SG2M)

Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM, La Tremblade)



THESE présentée par :

Pierrick MOREAU



Soutenue publiquement le 30 Octobre 2014

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Étude des interactions entre infection à ostreid herpesvirus 1, immunité, autophagie et pesticides chez l'Huître creuse, *Crassostrea gigas*

Jury :

Mathias Faure	(Université de Lyon I)	Rapporteur
Laure Giambérini	(Université de Lorraine)	Rapporteur
Catherine Dupuy-Papin	(Université de Tours)	Examineur
Paco Bustamante	(Université de La Rochelle)	Examineur
Béatrice Gagnaire	(IRSN, Saint-Paul-lez-Durance)	Examineur
Tristan Renault	(Ifremer, La Tremblade)	Directeur de thèse
Thierry Burgeot	(Ifremer, Nantes)	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury : le Professeur M. Faure et le Professeur L. Giambérini d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Docteur C. Dupuy-Papin, le Professeur P. Bustamante et le Docteur B. Gagnaire de me faire l'honneur d'être examinateurs de ce travail de thèse.

Enfin, je tiens à remercier les deux derniers membres de ce jury de thèse, le Docteur T. Renault et le Docteur T. Burgeot qui sont également mes deux directeurs de thèse.

Tristan, merci pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de cette thèse, me laissant pleinement organiser mon travail. Cela m'a permis de développer mon esprit scientifique et développer une collaboration avec un laboratoire étranger (CIMR – Cambridge). Cette collaboration m'a offerte une première expérience à l'étranger que je n'oublierai pas, confirmant mon désir de travailler dans le monde de la recherche. J'ai senti de ta part une grande confiance en moi, me laissant sans problème aller présenter mes travaux en France et à l'étranger. J'ai donc essayé de te rendre du mieux possible cette confiance tout au long de ce travail de thèse. Merci pour ton implication, tes conseils, ton expérience, les corrections et le temps consacré à cette fin de thèse (bien sur, il n'y a pas eu que la fin de thèse). Je te remercie encore et j'espère que nos routes se croiseront de nouveau dans le futur.

Thierry, merci également d'avoir cru en moi. Tu as toujours pris le temps de venir à La Tremblade ou de nous accueillir à Nantes pour de nombreuses discussions, ainsi que de nombreuses conversations téléphoniques. Tu as toujours été présent pour échanger sur différents sujets : manips, articles, congrès ou pour les corrections du manuscrit. J'espère également que nos routes se croiseront à nouveau. Enfin, je vous remercie tous les deux, notamment pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre passion.

Je remercie Jean Prou, directeur de la station de La Tremblade, pour son accueil, sa bonne humeur et le récit de ses expériences autour d'un bon repas.

Je remercie également l'Ifremer et la région Poitou-Charentes pour le soutien financier de cette thèse.

Ce travail de thèse a été effectué dans la Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM) et je tiens à remercier tous les membres de l'équipe qui ont contribué à la bonne ambiance qui y règne. Merci tout d'abord à Amélie pour avoir partagé

le bureau toujours dans la bonne humeur et la rigolade... , ainsi que pour avoir vécu et échangé notre expérience de thésard en meme temps. Nicole, je te remercie particulièrement pour m'avoir appris dès mon arrivée au laboratoire, une méthodologie et une efficacité dans le travail que j'ai toujours gardées par la suite. Cela m'a servi de nombreuses fois et me servira toujours par la suite. Ton professionnalisme est très appréciable, ainsi que ta bonne humeur. Enfin, merci d'avoir supporté les dérangements de fin de journée (tu dois comprendre ce que je veux dire !!!). Benjamin, je tiens également à te remercier pour ta bonne humeur et ton aide envers moi. J'aurais bien aimé continuer à travailler un peu plus longtemps avec toi. Je garderais un œil attentif sur la suite de tes recherches. A vous deux, Nicole et Benjamin surtout n'oubliez pas le JMS, vous comprenez vite de quoi je parle... . Agnès, je te remercie également pour ton enthousiasme et de m'avoir permis de compléter mes travaux en étudiant un autre pathogène. Merci pour le temps consacré à la réalisation de manips et des discussions que nous avons pu avoir. Delphine, également merci pour le temps consacré à la réalisation de ces manips et ta bonne humeur.

Je remercie de la même manière, toutes les personnes du laboratoire et de la station : Sylvie, Isabelle, Valérie, Claire, Philippe, Bruno, Céline, Coralie, Patrick, Serge, Véronique, Henri, l'équipe éclosion, les personnes du LERPC, stagiaires, etc. (désolé pour ceux que j'ai oublié).

Dimitri, je te remercie également pour la bonne ambiance et l'aide pour organiser le repas de Noël. Super souvenirs « Vindiou » !!!!

Martine et Florence, je tenais à vous remercier pour le super travail que vous réalisez. Vous êtes toujours efficaces et de bonne humeur. Ainsi c'est toujours avec plaisir que je passe vous dire bonjour le matin.

Merci à ma stagiaire Camille que j'ai encadrée pendant ma thèse. Je te souhaite bonne chance et aussi bonne continuation. Continue de travailler avec autant d'envie et de bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier deux amis, Guillaume et Magalie, pour leur soutien en cette fin de thèse. Merci de m'avoir changé les idées quand c'était nécessaire et merci pour la lecture Guillaume (pipi san te remercie, tu comprendras). Tu m'as fait rire avec la « schtroumpfette ».

Enfin il est temps maintenant de remercier la famille. Dans un premiers temps, comment ne pas remercier mes parents qui ont tout donné pour leur enfants. Vous avez cru en chacun de vos enfants et vous nous avez soutenu dans nos propres choix. Je ne sais pas comment vous remercier mais je pense que le simple fait de voir réussir vos enfants, est peut être le meilleur des remerciements. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous : à votre éducation, vos sacrifices et votre amour pour vos enfants. Romuald et Kevin, vous m'avez tous les deux donné à votre façon des modèles à suivre et vous avez toujours été là pour moi (étant le petit dernier de la famille, il fallait bien quelqu'un pour me protéger !!!). Nous avons une relation particulière qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Kevin, je tiens à te remercier personnellement car tu as toujours cru en moi. Je ne sais pas exactement par où commencer pour te remercier mais tu m'as apporté beaucoup dans ce travail de thèse. Réussir à travailler ensemble et mettre en place une collaboration est une très grande fierté pour moi. J'ai appris énormément à tes côtés, ainsi qu'aux côtés des membres du labo CIMR. Merci à toi et Anna de m'avoir accueilli chez vous pendant plus d'un mois, j'en garde que de bons souvenirs. Romuald, tu n'as peut être pas participé de la même manière mais tu as été tout aussi important et je suis fier d'être le parrain de Maxence (merci Romu et Sophie). Merci à tous les autres membres de la famille.

Damien (ma goldie), que de souvenirs ensemble. Je ne pouvais pas finir mes remerciements sans un mot pour toi. Nous avons commencé la fac ensemble et on connaît la suite !!! Je crois que je ne pouvais pas mieux tomber pour m'entendre aussi bien avec quelqu'un d'autre. Tu es bien plus qu'un ami. Les parties de poker à La Rochelle avec Thomas et les ppm... La collocation à Paris et le coco... la fête de la musique... vivement le prochain mois de Mai d'ailleurs si tu vois ce que je veux dire...

Enfin bien évidemment ma dernière pensée va à celle qui partage ma vie malgré la distance depuis le début de cette thèse. Laurie, tu as été là pour moi, tu m'as apporté un équilibre et un bien être dans ma vie. Tu m'as apporté beaucoup de bonheur et tu m'en apportes toujours. Nous avons affronté les épreuves ensemble en étant éloignés par la distance mais cela nous a rapproché encore plus. C'est avec grand plaisir que je finis l'écriture de cette thèse par ces quelques mots, puisque la prochaine étape de notre vie, nous allons l'écrire ensemble...

*Merci à vous tous,
Bonne lecture*

« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs n'a jamais tenté d'innover. »

Albert Einstein

Publications

Article n°1

Moreau P, Burgeot T, Renault T. 2014. Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays. Environmental Science and Pollution Research. 21(7) : 4940–4949.

Impact factor 2013 (Environmental Science and Pollution Research) : 2.757

Article n°2

Moreau P, Burgeot T, Renault T. 2014. In vivo effects of metaldehyde on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: comparing hemocyte parameters in two oyster families. Environmental Science Pollution Research 18 : 1-7

Impact factor 2013 (Environmental Science and Pollution Research) : 2.757

Article n°3

Moreau P, Faury N, Burgeot T, Renault T. Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Chemosphere (soumis)

Impact factor 2013 (Chemosphere) : 3.8

Article n°4

Moreau P, Moreau K, Segarra A, Tourbiez D, Travers MA, Rubinsztein DC, Renault T. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. Journal of Autophagy (In press).

Impact factor 2013 (Journal of Autophagy) : 11.423

Article n°5 (Annexe)

Renault T, **Moreau P**, Faury N, Pepin J-F, Segarra A, Webb S. 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. Journal of Virology. 86(10) : 5942–5947.

Impact factor 2013 (Journal of Virology) : 4.648

Article n°6 (Annexe)

Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, **Moreau P**, Pépin J-F. 2014. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Veterinary Research. 42(1) : 1-13

Impact factor 2013 (Veterinary Research) : 3.38

Article n°7 (Annexe)

Renault T, Tchaleu G, Faury N, **Moreau P**, Segarra A, Barbosa-Solomieu V, Lapegue S. 2014. Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens. Veterinary Research. 45(1) : 1-8

Impact factor 2013 (Veterinary Research) : 3.38

Communications orales et communications affiches

- Groupe Français des Pesticides 2012 à Poitiers. « *Étude des effets de pesticides sur les mécanismes de défense de l'huître creuse Crassostrea gigas : analyses des hémocytes en cytométrie en flux* » (Communication orale).

Pierrick Moreau, Thierry Burgeot et Tristan Renault

- Groupe Français des Pesticides 2013 à Albi. « *Etude « in vivo » des effets du métaldéhyde sur des hémocytes de deux familles d'huîtres creuses, Crassostrea gigas* » (Communication orale).

Pierrick Moreau, Thierry Burgeot et Tristan Renault

- Groupe Français des Pesticides 2014 à Schoelcher (Martinique). « *Pesticides et infection à ostreid herpesvirus 1 chez l'Huître creuse, Crassostrea gigas* » (Communication orale).

Pierrick Moreau, Nicole Faury, Thierry Burgeot et Tristan Renault

- International Union of Microbiology Society 2014 à Montréal. « *Host-pathogen interactions in Pacific oyster, Crassostrea gigas - Role of autophagy pathway* » (Communication affichée).

Pierrick Moreau, Kevin Moreau, Delphine Tourbiez, Marie-Agnès Travers, David Rubinsztein and Tristan Renault

- International Autophagy Conferences 2014 à Toulouse. « *Autophagy in Pacific oyster, Crassostrea gigas* » (Communication affichée).

Pierrick Moreau, Kevin Moreau, Morga Benjamin, Delphine Tourbiez, Marie-Agnès Travers, David Rubinsztein and Tristan Renault

Liste des abréviations

ACHé :	AcétylCholinEstérase
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPA :	Aminomethyl Phosphonic Acid (métabolite du glyphosate)
ARN :	Acide RiboNucléique
ATG :	Autopahgy-related Gene
CE :	CarboxylEstérases
CNC :	Comité National de la Conchyliculture
DCE :	Directive Cadre de l'Eau
DCSMM :	Directive Cadre Sur Le Milieu Marin
DDE :	1-1'-(2,2-dichloroéthénylidène)-bis-(4-chlorobenzene)
DDT :	Dichloro Diphényl Trichloroéthane
DGCCRF :	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
EDTA :	Ethylène Diamine Tétraacetic Acid
EST :	Expressed Sequenced Tags
FAO :	Food and Agriculture Organization
FDA :	Fluorescein DiAcetate
HCMV :	Human CytoMegaloVirus
HSP :	Heat Shock Protein
HSV :	Herpes Simplex Virus
IAP :	Inhibiteur d'apoptose
IFN :	Interféron
LGPM : :	Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins
MyD88 :	Myeloid Differentiation Factor 88

NH ₄ Cl :	Chlorure d'ammonium
NODU :	Nombre De Doses Unités
OCP :	OrganoChlorés Pesticides
ORF :	Open Reading Frame
OsHV-1 :	Ostreid Herpesvirus 1
PAMP :	Motif moléculaire associé à un pathogène
PAS :	Pré-autophagosome Structure
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PE :	Phosphatidyléthanolamine
PKR :	Protéine Kinase R
PMA :	Monoazide de propidium
PO :	PhénolOxydase
POP :	Persistent Organic Pollutant
ProPO :	ProPhénolOxydase
PRR :	Pattern Recognition Receptor
ROS :	Reactive Oxygen Species
SAU :	Surface Agricole Utile
TCBS :	Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar
TIMP :	Tissue Inhibitor Metallo-Proteinase
TLR :	Toll-like receptor
TOR :	Cible de la rapamycine
Wm :	Wortmannine

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	<u>1</u>
<u>Problématique de thèse</u>	<u>11</u>
<u>Revue bibliographique</u>	<u>15</u>
<u>I. Aquaculture et conchyliculture</u>	<u>16</u>
1. <i>Histoire de l'aquaculture et de la conchyliculture</i>	16
2. <i>Production conchylicole en France</i>	18
<u>II. Episodes de mortalité massive chez l'huître creuse</u>	<u>23</u>
<u>III. Agents infectieux chez l'huître creuse</u>	<u>24</u>
1. <i>Bactéries appartenant au genre Vibrio</i>	25
2. <i>Ostreid herpesvirus 1</i>	27
a. <i>Morphologie</i>	29
b. <i>Structure et organisation du génome viral</i>	30
c. <i>Diversité virale</i>	31
<u>IV. Huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i></u>	<u>33</u>
1. <i>Taxonomie et origine</i>	33
2. <i>Principaux pays producteurs</i>	34
3. <i>Habitat et biologie</i>	36
4. <i>Cycle de vie</i>	38
5. <i>Anatomie</i>	40
6. <i>Séquence du génome complet</i>	45
<u>V. Système immunitaire et mécanismes de défense chez les bivalves</u>	<u>47</u>
1. <i>Les hémocytes, des cellules à activités multiples</i>	47
2. <i>Propriétés des hémocytes</i>	50

a. Agrégation hémodcytaire	50
b. Plasticité, mobilité et adhésion	51
c. Chimiotactisme	52
3. <i>Fonctions des hémodcytes</i>	52
a. Réparation des blessures et de la coquille	52
b. Digestion, transports de nutriments et excréation	52
c. Détoxication des polluants	53
4. <i>Mécanismes de défense</i>	54
5. <i>Immunité anti-virale</i>	62
6. <i>Autophagie</i>	63
a. Mécanisme de formation des autophagosomes	66
b. Régulation de l'autophagie	71
c. Agents pathogènes et autophagie	71

VI. Facteurs environnementaux et pesticides 78

1. <i>Facteurs environnementaux</i>	78
2. <i>Pesticides</i>	82

Chapitre I : Effets de pesticides sur les activités hémodcytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* 89

1. <i>Sélection des pesticides</i>	90
2. <i>Articles</i>	92
<i>Article 1 : "Pacific oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays"</i>	93
<i>Conclusion et discussion</i>	117
<i>Article 2 : "In vivo effects of metaldehyde on Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>: comparing hemocyte parameters in two oyster families"</i>	119
<i>Conclusion et discussion</i>	139

Chapitre II: Effets des pesticides sur le virus OsHV-1 et la sensibilité des huîtres à l'infection virale

Article 3 :

"Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the Pacific oyster, Crassostrea gigas" 143

Conclusion et discussion 173

Chapitre III : Autophagie et infections chez l'huître creuse, Crassostrea gigas

Article 4 : *"Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and Vibrio aestuarianus infections"* 177

Conclusion et discussion 204

Discussion générale

1. *Influence des pesticides sur certaines activités hématocytaires et la sensibilité à l'infection virale à OsHV-1 chez l'huître creuse* 209

2. *Mécanisme de l'autophagie et son rôle possible comme mécanisme de défense vis à vis des maladies infectieuses chez l'huître creuse* 211

3. *Diversité génétique et sensibilité aux infections chez l'huître creuse* 213

4. *Conclusion & perspectives* 215

Références bibliographiques

Annexes

Articles 250

Article n°5 250

Article n°6 268

Article n°7 281

Table des illustrations 289

Figures :	289
Tableaux :	292
<i>Protocoles</i>	293
Extraction d'ADN: Kit Qlamp DNA (Qiagen)	293
Marquage au monoazide de propidium	295
Extraction des ARN au Trizol	296
Traitement avec Dnase Ambion des ARN extraits au Trizol	298
Extraction des protéines	300
SDS PAGE et Western blot	301
Cytométrie en flux	303
PCR en temps réel : expression comparative	304
<i>Encadrement de stagiaire</i>	306

Introduction générale

La conchyliculture, principal secteur d'activité de l'aquaculture française, fait face à la multiplication des usages du littoral et à la difficulté croissante de maintenir des eaux de qualité conformes à une réglementation de plus en plus stricte. Les ventes des produits de la conchyliculture nationale s'élevaient à 491 millions d'euros en 2010/2011. Les principaux secteurs d'activité sont l'ostréiculture (production d'huîtres) et la mytiliculture (production de moules). Avec 84 100 tonnes en 2010, la France produisait les 3/4 des huîtres européennes et était, avec près de 74 000 tonnes, le second producteur de moules en Europe derrière l'Espagne. L'activité conchylicole est répartie sur l'ensemble du littoral. Cependant, la Bretagne, le Poitou-Charentes et la Normandie représentent l'essentiel de la production de moules et d'huîtres. En 2010/2011, l'activité concernait 2 967 entreprises et représentait 9 215 emplois équivalent temps plein.

La conchyliculture européenne est également un secteur économique important avec 770 000 tonnes de production pour un chiffre d'affaires de 1 940 M€, 7 500 entreprises et 38 000 emplois directs. Huit principaux pays prennent une part significative dans cette filière, dont la France qui se classe au 2ème rang européen, avec une production moyenne en 2009 de 200 000 tonnes de coquillages pour un chiffre d'affaires de l'ordre de 774 millions d'euros. En termes de production, la conchyliculture européenne est dominée, à plus de 77 %, par les moules. Les huîtres représentent ensuite 18 %, et les autres coquillages environ 5 % de l'ensemble des productions. Au niveau mondial, l'ostréiculture française occupe la quatrième place derrière la Chine, le Japon et la Corée et représente 90 % de la production européenne d'huîtres. La production mondiale d'huîtres creuses a doublé entre 1950 et 1970, ainsi qu'entre 1970 et 2012, et diffère suivant la zone géographique considérée (Figure 1). En 2003, la Chine constituait le premier pays producteur avec 3.7 millions de tonnes, suivi du Japon (261 000 tonnes), de la Corée (238 000 tonnes) et de la France (115 000 tonnes) (Figure 1) (FAO, 2012). Ainsi, la Chine est à l'origine de 84 % de la production mondiale d'huîtres creuses.

Depuis 1950, des phénomènes de mortalité touchant les huîtres du Pacifique ont été signalés dans toutes les zones de production dans le monde. Le terme « mortalité estivale » a été principalement utilisé pour décrire les événements de mortalité survenant pendant les mois les plus chauds, affectant les huîtres adultes. Cependant, des cas de mortalité observés chez les naissains d'huîtres au printemps et en été, ont également été rapportés sous ce terme, en particulier en France.

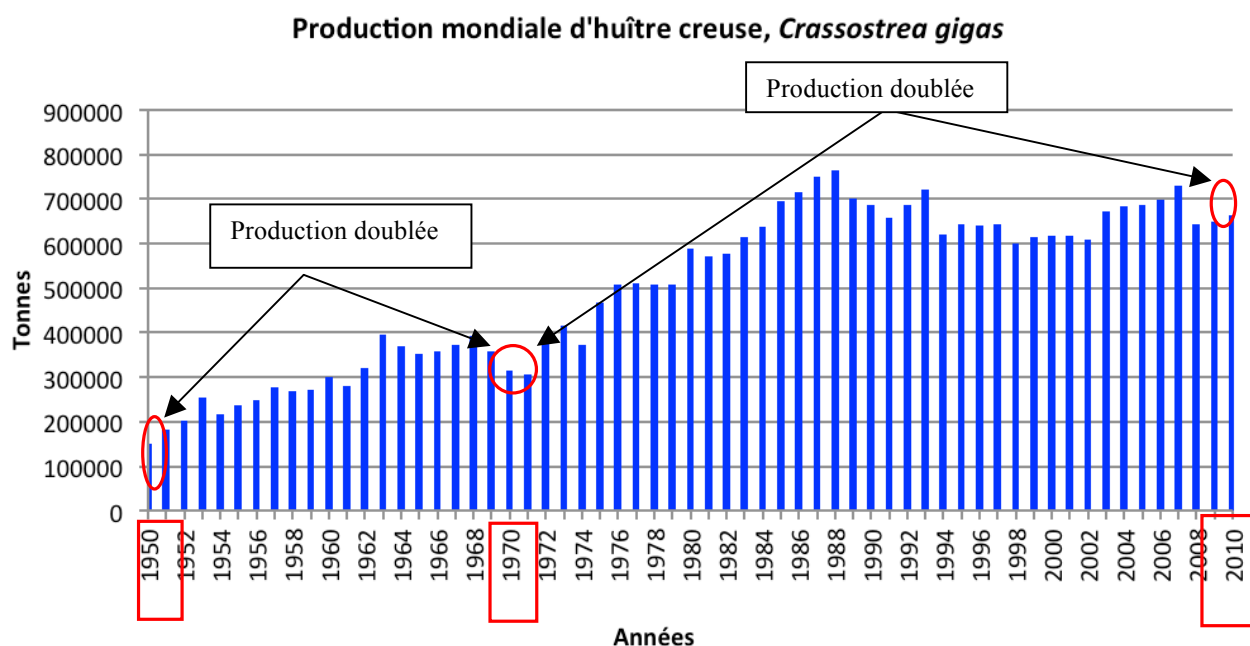


Figure 1. Production mondiale (sans la production chinoise) de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (FAO, Fishery Statistic, 2012)

Ainsi, des événements de mortalité massive d'huîtres adultes, *C. gigas*, ont été signalés au Japon, aux Etats-Unis et en France (Imai *et al.*, 1965; Mori, 1979 ; Beattie *et al.*, 1980 ; Perdue *et al.*, 1981 ; Maurer *et al.*, 1986). Depuis la fin des années 1970, des mortalités affectant les stocks cultivés ont été aussi observés en France dans différentes zones de production (Marennes-Oléron, Arcachon, Bretagne et Normandie) (Heral, *et al.*, 1978 ; Maurer *et al.*, 1986 ; Bodoy *et al.*, 1990 ; Goulletquer *et al.*, 1998 ; Fleury *et al.*, 2001 ; Costil *et al.*, 2005). Des épisodes de mortalité ont également été observés en été dans d'autres pays producteurs d'huîtres du Pacifique en Europe : République d'Irlande (Malham *et al.*, 2009), Espagne (Elanadaloussi *et al.*, 2009) et Pays-Bas (Van Banning, 1997). Plus récemment, des épisodes de fortes mortalités d'huîtres creuses adultes ont été rapportés en France (Rapports Repamo 2012,2013).

Des mortalités anormales ont également été signalées chez les naissains et les juvéniles de l'huître du Pacifique, associées avec des températures élevées de l'eau et des infections par un virus de type herpès (Renault *et al.*, 1994a ; Friedman *et al.*, 2005 ; Burge *et al.*, 2006). En France, des mortalités massives (de 80 % à 90 %) ont été rapportées au cours de l'été 1993, chez des animaux de trois à sept mois dans différents sites de la côte atlantique. La présence de particules virales de type herpès a été observée en microscopie électronique à transmission

dans les branchies et dans le manteau d'individus moribonds (Renault *et al.*, 1994a). Le virus a été identifié par la suite comme appartenant à la famille de malacoherpesviridae et dénomé ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Un lien de causalité entre épisodes de mortalité de naissain et détection du virus OsHV-1 a été mis en évidence au travers de résultats obtenus dans le cadre des analyses réalisées par le Réseau de Pathologie des Mollusques (Repamo) entre 1997 et 2006 (Renault, 2010 ; Garcia *et al.*, 2011). OsHV-1 a également été détecté par PCR dans les naissains d'huîtres touchés par des épisodes de mortalité en Californie (Friedman *et al.*, 2005 ; Burge *et al.*, 2006.).

Bien que l'huître creuse ait été initialement considérée comme une espèce robuste, des mortalités ont été signalées dans les stocks français depuis la fin des années 1970 et des mortalités considérables ont été rapportées à partir de 2008 en France, mais également en Europe associé en particulier à la détection du virus OsHV-1.

L'émergence de maladies infectieuses représente un facteur limitant au bon développement de l'aquaculture et peut engendrer de lourdes pertes économiques. De plus, l'intensification des élevages impliquant un nombre restreint d'espèces ainsi que le transfert d'animaux entre bassins de production et entre pays peuvent favoriser l'émergence et la dissémination de maladies infectieuses (Grizel, 1996b ; Goulletquer & Héral, 1997).

Cependant, bien que l'impact des maladies en aquaculture soit important, peu de moyens de lutte sont aujourd'hui disponibles. La vaccination au sens conventionnel du terme, largement utilisée dans d'autres filières d'élevage (par exemple, les bovins et les poissons), n'est pas envisageable pour les bivalves qui ne possèdent pas de mémoire immunitaire basée sur les lymphocytes. De plus, les bivalves vivent dans des eaux marines ouvertes et sont directement exposés aux agents pathogènes. La prévention sur la base d'un diagnostic rapide semble être l'un des meilleurs moyens de lutte. Différentes techniques sont également envisageables comme l'élevage en eaux profondes ou le développement de programmes de sélection d'animaux présentant des capacités de résistance accrue aux maladies infectieuses. Enfin, l'acquisition de connaissances concernant le système immunitaire paraît un élément essentiel. Les maladies infectieuses étant responsables de mortalités dans les élevages de bivalves d'intérêt économique tels que les huîtres, l'étude du système immunitaire et la compréhension des capacités de défense de ces organismes sont indispensables au bon développement d'une conchyliculture durable et économiquement viable.

Les interactions qui existent entre l'hôte et l'agent pathogène peuvent être influencées par l'environnement. D'après Snieszko (1974), le déclenchement d'une maladie infectieuse chez un hôte résulte d'interactions conduisant à un déséquilibre entre l'hôte et un agent pathogène, ce déséquilibre peut être dû à des facteurs externes (facteurs physico-chimiques, polluants, ...) et/ou internes aux deux protagonistes (virulence de l'agent infectieux, sensibilité accrue de l'hôte) (Figure 2). La gestion d'une maladie passe donc par la description et la compréhension des interactions entre hôte, environnement et agent pathogène.

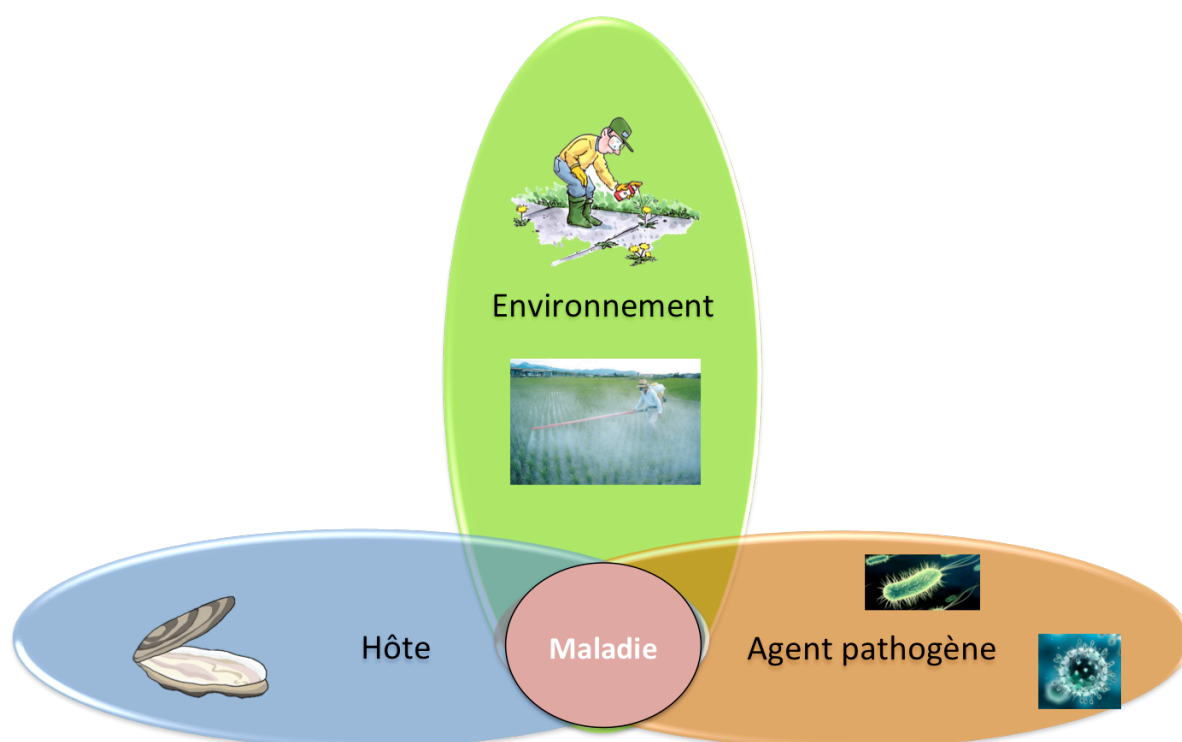


Figure 2. Schéma des interactions environnement-hôte-agent pathogène (modifié d'après Snieszko, 1974)

De plus, les questions environnementales sont aujourd'hui au cœur des préoccupations sociétales. Divers signaux sont considérés comme des alertes et sont de plus en plus pris en compte, en France et à l'étranger, par le monde politique qui se préoccupe de l'impact écologique des activités humaines sur l'environnement.

Si les pesticides ont constitué un progrès considérable dans la maîtrise des ressources alimentaires, la question de leur utilisation, de leur dissémination dans l'environnement et de leurs effets sur la santé humaine est une préoccupation majeure de nos jours. Les pesticides ont grandement contribué à l'amélioration de la santé publique en permettant, d'une part, d'éradiquer ou de limiter la propagation de maladies parasitaires (en éliminant les insectes vecteurs de ces maladies) et d'autre part, d'augmenter les productions alimentaires permettant ainsi de mieux répondre aux besoins des populations au niveau mondial. Cependant, l'Union Européenne, et notamment la France, se sont engagées dans un processus de réduction de l'emploi de pesticides en agriculture. En France, un plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides a été mis en place en 2006 et Le Grenelle de l'environnement a confirmé les orientations de ce plan en prenant plusieurs engagements intégrant :

- une réduction de moitié, à l'horizon 2018 de l'emploi de pesticides de synthèse (plan ECOPHYTO 2018),
- le passage en agriculture biologique à 6 % de la Surface Agricole Utile (SAU) en 2010, en visant 20 % en 2020.

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées pour lutter principalement contre les parasites animaux ou végétaux nuisibles aux activités agricoles et pour accroître les rendements. Ainsi, le terme pesticides désigne les substances ou les préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries.

Dès 2008, plusieurs mesures ont été prises, notamment l'interdiction de 30 produits jugés les plus toxiques, l'instauration d'une taxe sur les phytosanitaires, taxe croissante en fonction de leur niveau de toxicité qui devrait également augmenter au fil des années et l'octroi de crédits d'impôt en faveur de l'agriculture biologique. Dans le plan ECOPHYTO 2018, différentes actions visent à améliorer l'information des agriculteurs (création d'un réseau d'épidémiosurveillance), à diffuser les bonnes pratiques agricoles (création de réseaux de fermes de référence), à développer les formations et à améliorer l'utilisation du matériel. Un indicateur (Nombre de doses unités : NODU), mis en place pour suivre la consommation des pesticides, est calculé depuis 2008. Il doit permettre d'aider à l'évaluation de l'atteinte de l'objectif pour réduire de moitié l'emploi des pesticides.

Les zones côtières constituent des milieux d'interface en constante évolution et sont souvent peuplées par des communautés vivantes abondantes. Les relations entre le débit des fleuves, les apports en matières organiques et en nutriments et la production primaire estuarienne sont bien connues et l'importance de la pollution de ces zones par divers composés toxiques est avérée. La France étant l'un des premiers pays européens pour l'utilisation de pesticides avec 78 000 tonnes (le bilan 2010 du suivi de pesticides en Poitou-Charentes et en Bretagne « CORPEP Bretagne, qualité des eaux » ; Barrault., « Suivi de la qualité des eaux superficielles vis-à-vis des pesticides », 2006, Kaczmaryk ., plan écophyto2018 : « Contamination de l'environnement par les produits phytosanitaires en Poitou-Charentes » 2006-2010, Réseau CORPEP., « Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes », 2010, 2009 et 2008) de produits phytosanitaires épandus sur les terres agricoles. De nombreux pesticides sont ainsi retrouvés dans les eaux côtières françaises, notamment dans les différents bassins de production ostréicole (Munaron *et al.*, 2006 ; le bilan 2010 du suivi de pesticides en Poitou-Charentes et en Bretagne « CORPEP Bretagne, qualité des eaux »). La présence de ces pesticides dans l'eau représente un risque environnemental déjà documenté au travers de travaux antérieurs (Rostagno *et al.*, 1999 ; Gagnaire *et al.*, 2003 ; Tanguy *et al.*, 2005 ; Gagnaire *et al.*, 2007). Dans le contexte des épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses, *C. gigas*, rapportés en France depuis 2008, il apparaît de la première importance de préciser les effets de ces pesticides sur la santé de ce coquillage et sa sensibilité aux agents infectieux, plus particulièrement au virus OsHV-1. Depuis le début des années 90, des mortalités récurrentes sont associées à la détection d'un herpès virus chez l'huître creuse (Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994a), identifié ultérieurement comme le virus OsHV-1. Ce virus peut être considéré comme un des agents infectieux majeur affectant les élevages ostréicoles en France. En 2008, des épisodes de mortalité massive ont été rapportés dans l'ensemble des régions de production d'huîtres creuses en France, et dans certaines zones en Irlande et au Royaume Uni. Les données disponibles suggèrent que le virus OsHV-1 est une cause prépondérante avec la détection d'un génotype viral particulier, appelé μ Var, à partir de 2008 (Segarra *et al.*, 2010 ; Renault *et al.*, 2012).

Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution des espèces au travers de nombreuses interactions entre hôtes et agents infectieux. Ce système contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les constituants étrangers (virus, bactéries et parasites). Cependant, plusieurs polluants, présents dans l'environnement, peuvent agir sur les composantes du système immunitaire et interférer ainsi avec leurs fonctions de protection

de l'organisme (Kouassi *et al.*, 2001). L'immunotoxicité peut être ainsi définie comme l'ensemble des effets délétères provoqués par un polluant ou par toute autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire à la suite d'une exposition de l'organisme hôte. Différents types d'effets immunotoxiques sont possibles incluant l'immunosuppression qui peut favoriser le développement des maladies infectieuses. S'il existe de nombreux exemples concernant les relations qui peuvent exister entre pollution et augmentation de la sensibilité aux maladies chez les mammifères et les vertébrés (Grinwis *et al.*, 2001 ; van Loveren *et al.*, 2001), peu de travaux ont été réalisés chez les invertébrés (Galloway & Depledge, 2001). En effet, peu d'études ont porté sur l'immunosuppression induite par les pesticides chez les différents groupes d'invertébrés alors qu'ils constituent 95% de l'ensemble des espèces animales recensées sur la terre.

L'huître creuse, *C. gigas*, étant donné son importance économique pour l'aquaculture tant au plan national qu'au plan international et sa position phylogénique, apparaît comme un modèle de choix pour tenter de définir l'importance du système immunitaire comme cible des pesticides chez les invertébrés. De nombreux travaux de recherche ont été réalisés sur cette espèce. De récents travaux ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances notamment au niveau moléculaire. La publication du génome de *C. gigas* (Zhang *et al.*, 2012), constitue une ainsi importante avancée scientifique. Cette huître originaire du Pacifique du nord-ouest est considérée comme invasive dans plusieurs régions du monde. Elle a développé plusieurs traits nécessaires à la survie d'un organisme vivant dans un environnement fluctuant. Pour s'alimenter, elle filtre une eau pouvant être contaminée par différents composés ou organismes. Zhang et coll. (2012) ont comparé son génome à celui de sept autres espèces séquencées. Ces auteurs ont ainsi pu identifier plus de 8600 gènes spécifiques à ce mollusque. Le génome de *C. gigas* comporte également 88 gènes codant pour des heat shock proteins (HSP) qui jouent un rôle majeur dans la protection des cellules contre les agressions (substances toxiques, ...). La disponibilité du génome a également ouvert de nouvelles possibilités pour étudier le système immunitaire.

Les mortalités observées chez cette espèce, tout particulièrement en périodes printanière et estivale, peuvent laisser suspecter un rôle important joué par les pesticides d'utilisation saisonnière, associés à des arrivées d'eau douce dans les zones d'élevage.

Dans ce contexte, les effets de certains pesticides préalablement choisis sur la base de leur présence dans le milieu et de leur nature ont été évalués pour leur capacité à moduler les capacités de défense de l'huître creuse, *C. gigas*, et d'influer sur le développement de l'infection à OsHV-1. Des avancées récentes en matière de recherche comme la démonstration du pouvoir infectieux du virus au stade naissain et le développement d'un modèle d'infection expérimentale (Schikorski *et al.*, 2011a ; Schikorski *et al.*, 2011b), la mise en évidence de gènes impliqués dans l'immunité en réponse à l'infection virale (Renault *et al.*, 2011 ; Jouaux *et al.*, 2013 ; Green *et al.*, 2014 ; Segarra *et al.*, 2014) ou bien encore la démonstration de différences de sensibilité à l'infection chez différentes familles d'huîtres (Sauvage *et al.*, 2010, Segarra *et al.*, 2014), permettent aujourd'hui une meilleure exploration des effets de pesticides dans le processus infectieux.

Problématique de thèse

Le travail de thèse s'inscrit dans la problématique très actuelle des mortalités massives de naissain et de juvéniles d'huîtres creuses, *C. gigas*, et des questionnements autour de l'implication des pesticides dans ce phénomène.

Un travail préliminaire a consisté à sélectionner des molécules d'intérêts (pesticides) les plus représentatifs des milieux aquatiques marins, mais également les plus toxiques potentiellement pour l'huître creuse, *C. gigas*.

La première partie de la thèse a été consacrée à l'étude des effets de pesticides sur les capacités hématocytaires de l'huître creuse (*in vitro* et *in vivo*). Les effets des pesticides sélectionnés (seul ou en mélange) ont été explorés principalement au travers de la cytométrie en flux.

La deuxième partie de la thèse a concerné l'étude des effets d'un mélange de pesticides sélectionnés sur le virus OsHV-1. Les effets des pesticides sur le virus ont été évalués au travers d'expérimentations en conditions contrôlées. Pour cela, des suspensions virales (préparées à partir de tissus d'huîtres infectées broyées et filtrées) ont été mises au contact d'un mélange de pesticides à différentes concentrations. Les effets sur le virus lui-même ont été analysés d'une part (*in vitro*), au travers de la quantification des capsides virales intègres par une technique de PCR en temps réel et l'utilisation de monoazide de propidium (PMA) (Renault *et al.*, com. personnelle). D'autre part, la virulence du virus après traitement par le mélange de pesticides a été explorée par injection à des animaux sains. Enfin, les effets des polluants sur les huîtres elles-mêmes et leur sensibilité à l'infection virale ont été analysés chez des animaux ayant été au contact avec un mélange de pesticides préalablement à une infection expérimentale (Schikorski *et al.*, 2011a ; Schikorski *et al.*, 2011b).

La troisième partie de la thèse a été consacrée à l'étude de l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*. La publication de son génome complet en 2012 (Zhang *et al.*, 2012) a ouvert de nouvelles possibilités pour étudier l'immunité innée chez cette espèce. L'étude de l'autophagie a consisté lors d'une première étape en la recherche *in silico* de gènes impliqués dans cette voie et des protéines correspondantes par western blotting. Puis, le rôle de ce processus important dans l'immunité innée a été exploré au travers d'essais de reproduction d'infections en présence ou non de modulateurs de l'autophagie.

Enfin, les résultats obtenus au cours des travaux de thèse ont été intégrés dans un schéma d'interactions afin de mieux appréhender les relations complexes entre l'huître creuse, le virus OsHV-1 et certains pesticides. Cela devrait permettre de contribuer à établir un lien de causalité possible entre la présence de pesticides dans l'environnement et une sensibilité accrue des animaux au phénomène de mortalité massive chez l'huître creuse.

Revue bibliographique

I. Aquaculture et conchyliculture

1. Histoire de l'aquaculture et de la conchyliculture

L'aquaculture, terme générique pour désigner toutes les activités de production animale ou végétale en milieu aquatique, se pratique en mer (mariculture), en rivières ou dans des étangs. Elle concerne notamment les productions de poissons (pisciculture), de coquillages (conchyliculture), de crustacés (astaciculture et pénéculture), de coraux (coraliculture) ou encore d'algues (algoculture). L'aquaculture est l'une des réponses apportées à la stagnation des prises de pêche et aux besoins croissant en matière d'alimentation. En 2008, l'aquaculture fournissait dans le monde 76.4 % des poissons d'eau douce, 68.2 % des poissons diadromes, 64.1 % des mollusques, 46.4 % des crustacés et 2.6 % des poissons marins consommés par l'homme. Elle peut être utilisée pour d'autres motifs que la consommation alimentaire. Par exemple, en Europe de nombreuses "stations piscicoles" ont été construites entre 1850 et 1870, dans les Alpes notamment, pour fournir du poisson pour le repeuplement de rivières et d'étangs, pour la pêche de loisir. Au Japon, l'élevage de crevettes ou d'ormeaux a été entrepris pour réintroduire dans l'environnement ces animaux dans des sites où ils ont été surexploités ou ont disparu pour d'autres causes (pollution, etc.).

L'aquaculture est une activité très ancienne, apparue en Égypte et en Chine au IV^e millénaire avant Jésus Christ. Elle pouvait concerner des espèces élevées pour l'alimentation, ou pour d'autres raisons (poissons d'apparat tels que les carpes Koï), ou encore la culture de plantes aquatiques (par exemple l'ipomée ou la châtaigne d'eau). Une aquaculture extensive existait dans toute l'Europe dès le Moyen Age, pratiquée dans une multitude de mares et de réseaux d'étangs. Elle fournissait alors un complément alimentaire important aux populations.

Des traces de coquilles d'huîtres ont été retrouvées dès la Préhistoire attestant leur consommation très ancienne par l'homme, mais les Chinois furent les premiers éleveurs de coquillages. Ainsi, ils ont inventé un ingénieux système de pieux de bambou plantés dans le sol et dont les entailles portaient des coquilles comme supports de fixation. En Europe, l'ostréiculture a été développée autour de 600 avant Jésus Christ. Sergius Orata est le premier à l'époque romaine à créer des parcs à huîtres en faisant grossir dans des lagunes des animaux provenant du littoral. L'espèce alors exploitée était l'huître plate, *Ostrea edulis*, espèce autochtone. Les Romains sont parvenus à fixer les larves d'huîtres sur des branches d'arbres, maîtrisant ainsi l'ensemble du cycle de vie. Ils faisaient une grande consommation ainsi qu'un

commerce actif d'huîtres. Au Moyen-Age, les huîtres étaient consommées par les populations aisées dans les villes et constituaient une base importante de l'alimentation des populations dans les régions de production.

A la Renaissance, de nombreux marchands d'huîtres ont fait leur apparition à Paris. Plus tard, sous Louis XIV, les huîtres vertes ont connu un réel développement alors que l'élevage en claires s'était généralisé dans la région de Marennes. A partir du 18^{ème} siècle, la production a augmenté prodigieusement. Seules les huîtres plates (*O. edulis*) étaient connues sur les côtes françaises. Les prélèvements dans les stocks naturels étaient de plus en plus importants et une pénurie s'annonçait. Dès 1750, des tentatives de protection de cette ressource ont été mises en place au travers d'interdictions temporaires de pêche, puis avec des autorisations spéciales pour exploiter le domaine public maritime. Ces réglementations étaient cependant très difficiles à faire accepter par les populations locales dont la survie dépendait de cette activité.



Figure 3. Parcs à Huîtres dans l'Ile de Ré (CNC-France)

En 1854, De Bon, commissaire de la pêche, a inventé un système de plancher-collecteur qu'il a installé au-dessus des bancs durant la période de frai afin de collecter le naissain. Le naturaliste Victor Coste, la même année, étudiant le captage et l'élevage du naissain, a expérimenté les premiers parcs d'élevage à Arcachon, puis en Baie de Saint-Brieuc. En s'inspirant des techniques romaines, il est parvenu à implanter la culture des huîtres sur la côte atlantique. Ainsi, les parcs se sont multipliés un peu partout sur le littoral atlantique

(Figure 3), mais également en Méditerranée, avec des techniques toujours plus perfectionnées.

2. Production conchylicole en France

Pour les huîtres creuses, *C. gigas*, la France, première au rang européen, consomme la majeure partie de sa production et exporte un peu plus qu'elle n'importe (Aquaculture - Ifremer). La France est aujourd'hui de loin, le plus gros producteur européen d'huîtres avec une production avoisinant les 84 100 tonnes en 2010/2011. Deux événements majeurs ont marqué l'ostréiculture française :

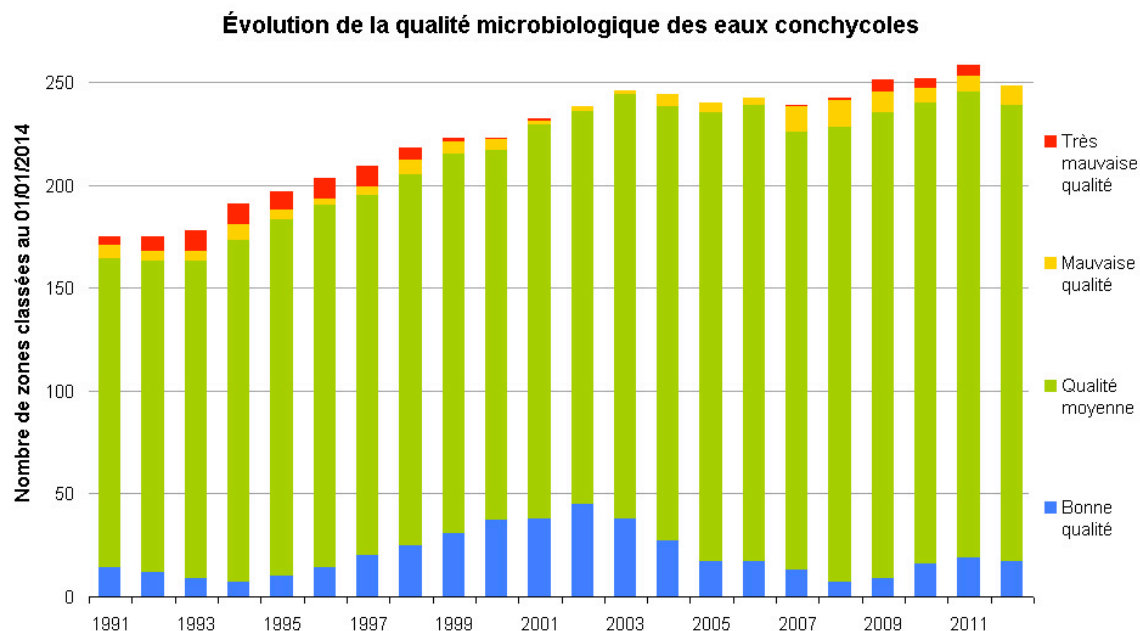
- la réduction des productions de l'huître plate, *O. edulis*, en lien avec des maladies parasitaires à partir de 1968 et de 1979,
- la disparition en 1970 de l'huître portugaise, *C. angulata*, remplacée par l'espèce *C. gigas*, introduite à partir du Canada et du Japon.

L'huître creuse japonaise (ou du Pacifique) a tout d'abord été importée dans les années 20 sur les côtes ouest du Canada et des Etats Unis, puis en Océanie en Australie (Tasmanie) et en Nouvelle-Zélande, dans les années 50 (Figure 6). Au début des années 70, des importations massives de naissain ou de géniteurs du Japon et de Colombie Britannique, ont permis de relancer l'ostréiculture française, l'espèce principalement exploitée *C. angulata* étant en voie de disparition en France (Figure 5).

Aujourd'hui, les huîtres sont principalement commercialisées à partir de sept régions: Normandie (19.5 %), Bretagne Nord (22.9 %), Bretagne Sud (7.2 %), Pays de la Loire (8.4 %), Poitou-Charentes (24.1 %), Aquitaine (7.2 %) et Méditerranée (9.1 %) (Figure 7).

La France est placée au 4ème rang pour les moules, mais fournit à peine 60 % de sa consommation (Aquaculture - Ifremer). A ces espèces principales s'ajoutent, l'huître plate, les palourdes, la coque et le bigorneau. D'autre part, la production de perles de culture est devenue la première activité économique de la Polynésie Française (Aquaculture - Ifremer). Enfin, la production de coquilles Saint-Jacques d'écloserie en vue de repeuplement permet d'approvisionner certains gisements de Bretagne exploités par la pêche (Aquaculture - Ifremer). Avec une production d'un peu plus de 200 000 tonnes de coquillages pour la consommation et plus de onze tonnes de perles de culture en 2001 (OFIMER, 2008), l'activité

conchylicole représente ainsi un poids socio-économique primordial pour les régions côtières françaises et nécessite d'être soutenue et optimisée par la recherche.



Note : mesures effectuées pour les bivalves non fouisseurs, moyenne glissante sur trois années calendaires. Par exemple, les valeurs présentées pour 2012 correspondent à la moyenne des résultats pour 2009-2012

Source : Ifremer, Remi, 2014.

Figure 4. Evolution de la qualité microbiologique des eaux conchycoliques en France de 1991 à 2012. Mesures effectuées pour les bivalves non fouisseurs, moyenne glissante sur trois années calendaires. Par exemple, les valeurs présentées pour 2012 correspondent à la moyenne des résultats pour 2009-2012. (Source : Ifremer, REMI, 2014)

De nombreux aléas pèsent sur les activités conchylicoles en France. Les conflits d'usage liés à l'occupation de l'espace littoral s'aggravent de nos jours (nautisme, déversement des sédiments portuaires dragués en mer, ...). Le renforcement des normes de qualités de l'eau ou sanitaires peuvent être également à l'origine de l'interdiction de la vente des produits et provoquer ponctuellement ou de manière chronique des problèmes de trésorerie importants pour les entreprises. La qualité microbiologique des eaux conchylicoles des zones de production (définie sur la base de la détection de bactéries *Escheria coli*) a eu tendance à s'améliorer jusqu'en 2002. Après une phase de stabilité, elle semble depuis présenter de moins bons résultats avec une augmentation progressive de la part des zones en qualité « mauvaise » et une diminution des zones en bonne qualité (17 en 2012, soit 7 %). Ainsi, près de 90 % des eaux présentaient une qualité moyenne en 2012 (Figure 4). Les causes de cette évolution sont complexes et peuvent être dues à plusieurs facteurs : l'inadéquation des ouvrages de traitement des eaux usées face à l'augmentation de la population, un dysfonctionnement du réseau liés aux fortes pluviométries, aux variations saisonnières de la population (tourisme) et à l'évolution des pratiques agricoles (élevage, épandage...).

La recherche de phytotoxines est aussi réalisée sur les zones de production, par la surveillance des « bloom » du phytoplancton et se déroulent à différentes périodes de l'année en fonction des espèces et du lieu où ces efflorescences se produisent.

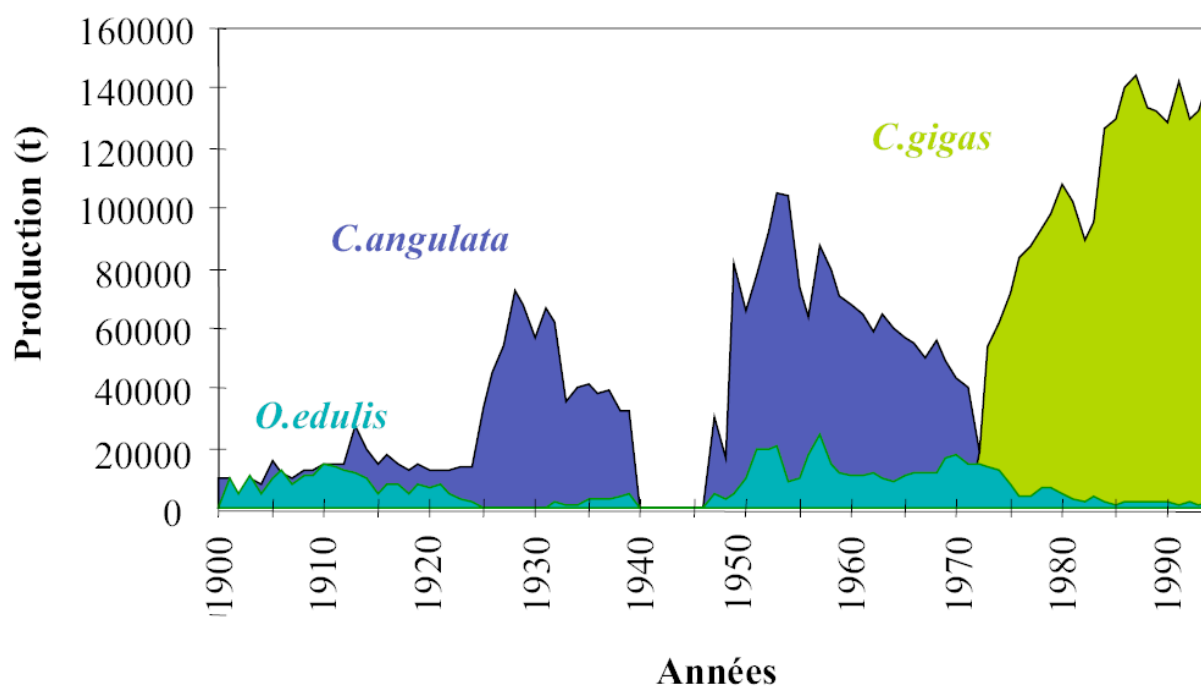
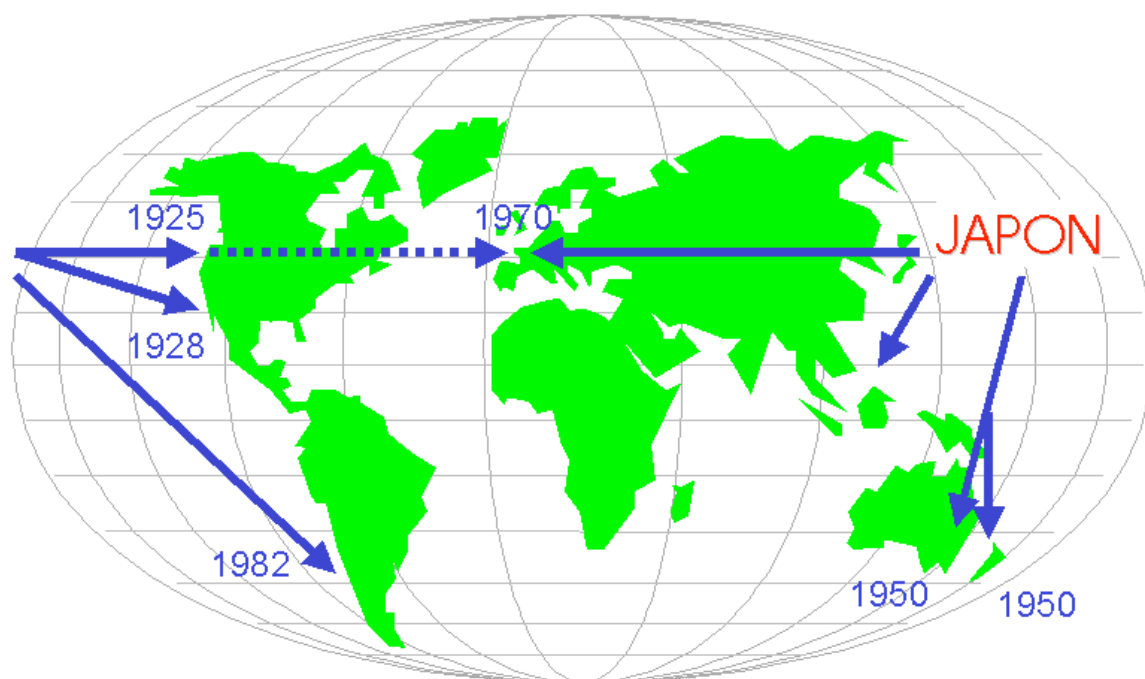


Figure 5. Production d'huîtres en France au cours du XX^{ème} siècle (Goulletquer *et al.*, 1998)



Source : Ifremer/H. Grizel

Figure 6. Introduction de *Crassostrea gigas* dans le monde (source : Ifremer/ H. Grizel 2012).

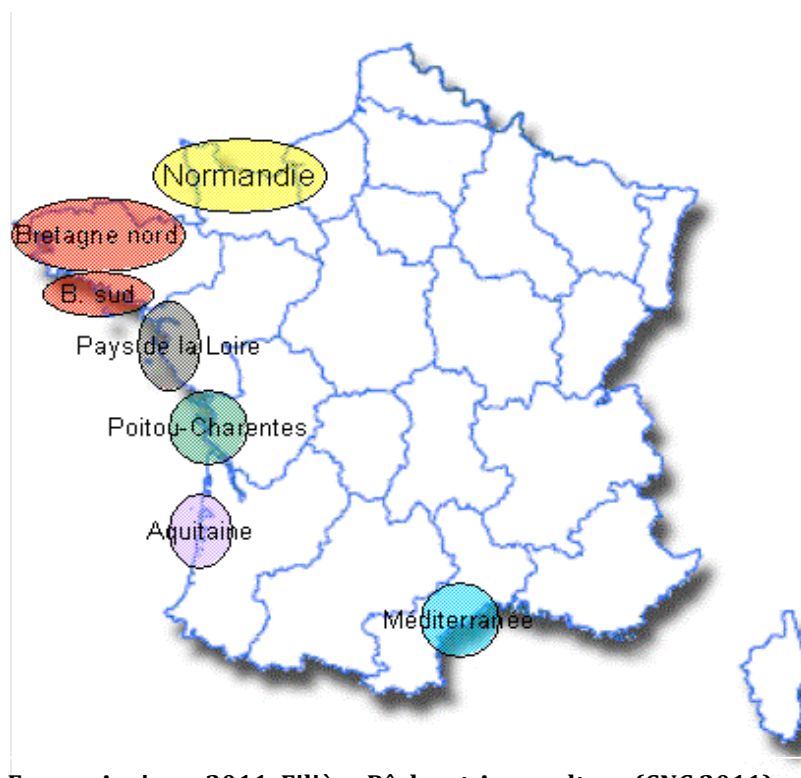


Figure 7. Bilan France Agrimer 2011, Filière Pêche et Aquaculture (CNC 2011).

II. Episodes de mortalité massive chez l'huître creuse

L'émergence de maladies infectieuses pouvant être associée à des conditions d'élevage intensif représente un facteur limitant pour le développement de l'aquaculture. L'ostréiculture française a fait face à différents épisodes de mortalité massive ces dernières décennies. En effet, durant les années 70, deux protozoaires, *Martelia refringens* et *Bonamia ostreae* ont fait chuter la production d'huître plate, *O. edulis*, d'environ 15 000 à moins de 2 000 tonnes par an (Grizel *et al.*, 1974 ; Pichot *et al.*, 1980). De même, l'huître portugaise, *C. angulata*, introduite et cultivée depuis 1860, a subi deux épisodes de mortalité associés à la détection de virus de type iridovirus (Comps, 1988). Afin de faire face à la disparition de *C. angulata*, l'importation massive de l'huître creuse *C. gigas* a été réalisée en France au début des années 70 en provenance du Japon et du Canada.

Le développement des activités d'aquaculture et plus particulièrement de conchyliculture ces dernières décennies a ainsi été accompagné par l'augmentation et la large distribution de maladies infectieuses dont l'impact sur la productivité et la qualité des produits est aujourd'hui unanimement reconnue comme devant être pris en compte pour une aquaculture durable. Bien que l'huître creuse, *C. gigas*, ait été initialement considérée comme une espèce particulièrement robuste, des épisodes de mortalité massive ont été rapportés depuis la fin des années 1980 en France. Ils ont pris une ampleur particulière à partir de 2008 en France et dans d'autres États Membres de l'Union Européenne (Irlande, Jersey et Angleterre). En effet, depuis 2008, des mortalités massives (40 à 100 %) ont été rapportées chez les jeunes huîtres, l'huître creuse apparaissant comme la seule espèce de bivalve touchée. Ces mortalités ont présenté une extension jamais égalée depuis l'introduction de cette espèce sur le littoral français. En effet, l'ampleur du phénomène a été sans précédent, tous les bassins ostréicoles ayant vu disparaître entre 40 et 80 % de leurs stocks de naissain. Le phénomène a affecté essentiellement le naissain (animaux de moins d'un an) et les juvéniles dans un moindre mesure (animaux de plus d'un an et de moins de 18 mois), toutes origines confondues. Il a été caractérisé par la quasi-simultanéité des épisodes sur l'ensemble des façades maritimes françaises en 2008 et dans des écosystèmes très variés.

En 2008, le phénomène a également été rapporté dans trois baies en Irlande (EFSA, 2010). Des épisodes comparables ont été décrits en 2009, en France. Comme en 2008, ils ont touché le naissain d'huîtres et des juvéniles, de toutes origines (captage et écloséries), diploïdes comme triploïdes. En Irlande, le phénomène a été observé dans 16 baies en 2009 et dans un

site de production à Jersey (EFSA, 2010). En 2010, en plus des sites affectés en 2009, des épisodes ont été rapportés dans la région du Kent en Angleterre (EFSA 2010).

De nombreux cas de mortalité massive ont fait alors l'objet d'investigations afin de rechercher la présence d'agents infectieux (agents à déclaration obligatoire, agents endémiques en France et en Europe comme le virus OsHV-1 et agents émergents). Des échantillons ont été collectés dans différents sites affectés de plusieurs États Membres et ont fait l'objet d'analyses (histologie, isolement et identification des bactéries majoritaires et recherche du virus OsHV-1 par PCR/PCR en temps réel). Les résultats des tests diagnostiques réalisés en France et dans d'autres États Membres ont permis de montrer :

- ✓ qu'aucun agent infectieux à déclaration obligatoire n'était détecté associé aux épisodes de mortalité observés,
- ✓ que le virus OsHV-1 était détecté par PCR en temps réel dans la majorité des échantillons, tout particulièrement chez les animaux moribonds,
- ✓ et que des bactéries appartenant au groupe *Vibrio Splendidus* était également fréquemment détectées chez les animaux.

Dans ces conditions, les mortalités massives des huîtres creuses ont été attribuées à la combinaison de facteurs défavorables avec la présence d'agents infectieux, tout particulièrement du virus OsHV-1 et de bactéries appartenant au genre *Vibrio* (EFSA 2010 ; Segarra *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2012).

Plus récemment, des épisodes de fortes mortalités d'huîtres creuses adultes ont été rapportés en France en lien avec la détection d'une bactérie, *V. aestuarianus* (Rapport Repamo 2013). En conditions expérimentales, des isolats appartenant à cette espèce bactérienne sont capables d'induire d'importantes mortalités chez des animaux initialement en bonne santé (Garnier *et al.*, 2007, De Decker *et al.*, 2011).

III. Agents infectieux chez l'huître creuse

Des agents infectieux, tels que des bactéries appartenant aux espèces *V. splendidus* et *V. aestuarianus* ainsi que le virus OsHV-1, sont fréquemment associés à des épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses rapportés dans la quasi-totalité des sites ostréicoles français (Saulnier *et al.*, 2010 ; Segarra *et al.*, 2010 ; Garcia *et al.*, 2011).

1. Bactéries appartenant au genre *Vibrio*

Retrouvées en abondance dans le milieu marin, les bactéries appartenant au genre *Vibrio* ou vibrions sont des organismes dont le mode de vie est typiquement aquatique. Elles appartiennent à la classe des γ -proteobacteria et à la famille des Vibrionaceae qui comprend également les genres *Photobacterium* et *Salinivibrio*. Le genre *Vibrio* regroupe des bactéries Gram négatif, droites ou incurvées, non-sporulées, de 0,5 à 1 μm de diamètre sur 1,2 à 3,5 μm de longueur. Les espèces appartenant au genre *Vibrio* sont généralement mobiles en milieu liquide grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Cependant, certaines en sont dépourvues et immobiles. Elles sont aéro-anaérobies facultatives et présentent un métabolisme oxydatif et fermentatif, et sont le plus souvent oxydase positives, nitrate réductase positives et chimio-organotrophes, fermentant le D-glucose comme source de carbone et d'énergie et utilisant des ions NH_4^+ comme source d'azote. Les vibrions sont cultivables sur milieu non sélectif de la flore hétérotrophe marine de type « marine agar » formant des morphotypes variables et certains poussent également sur la gélose Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar (TCBS) développée à l'origine pour l'isolement sélectif de *V. cholerae*. La quasi-totalité des vibrions exige la présence de sodium dans le milieu, indispensable à leur croissance. Chaque espèce présente un preferendum thermique pour sa croissance, compris pour la majorité d'entre elles entre 10 et 40°C.

En aquaculture marine, les vibrions sont à l'origine de la plupart des maladies bactériennes touchant tous les types de filières de production, poissons, crustacés ou mollusques. D'autres bactéries sont parfois associées à des épisodes infectieux, comme certaines α -protéobactéries proches des rickettsies, plus rarement des mycobactéries, mais leur impact économique demeure très inférieur à celui des vibrioses (Azevedo et Villalba 1991 ; Lightner et Redman 1994 ; Lightner et Redman 1998). Les recherches menées au sujet des maladies bactériennes des filières aquacoles mondiales ont largement bénéficié des schémas d'étude et de caractérisation des vibrions pathogènes pour l'homme et de leurs facteurs de virulence.

Les vibrions apparaissent comme le genre bactérien le plus impliqué dans les épisodes de mortalités dues à des infections bactériennes chez les mollusques. Concernant la classe des gastéropodes, plusieurs espèces de *Vibrio* ont été associées à des épisodes de mortalité chez l'ormeau : *V. alginolyticus* a été isolé d'ormeaux malades des espèces *Haliotis rufescens* (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998) et *H. diversicolor supertexta* (Liu *et al.*, 2001). Par ailleurs, *V. harveyi* (*carchariae*) a été associé à une épizootie chez l'ormeau *H. tuberculata* en

écloserie (Nicolas *et al.*, 2002) et probablement à des mortalités massives dans le milieu naturel en France (Travers *et al.*, 2009). Par ailleurs, chez les bivalves de nombreux cas de vibrioses ont été décrits affectant principalement les stades larvaires en écloserie (Tubiash *et al.*, 1965; DiSalvo *et al.*, 1978; Elston *et al.*, 1982 ; Jeffries, 1982; Hada *et al.*, 1984; Paillard *et al.*, 2004). Notamment, une souche de *V. splendidus* biovar II a été associée à des mortalités de larves d'huître creuse, *C. gigas* (Sugumar *et al.*, 1998) et des souches apparentées à *V. splendidus* dont *V. pectenica*, ont également été associées à des mortalités de larves de la coquille Saint Jacques, *Pecten maximus* (Lambert, 1998; Lambert *et al.*, 1998). De plus, *V. tubiashii*, décrit initialement comme un agent pathogène de larves de plusieurs espèces de bivalves potentiellement impliqué dans la maladie alors nommée « bacillary necrosis » (Tubiash *et al.*, 1965), a été identifié plus tard comme l'agent causal de cette maladie (Hada *et al.*, 1984). De nombreuses études ont porté sur cette infection bactérienne affectant considérablement la production d'écloseries et de nurseries de bivalves (Elston et Leibovitz, 1980 ; Takahashi *et al.*, 2000). Récemment, la ré-émergence de *V. tubiashii* causant de sévères épisodes de mortalité a été rapportée dans des écloseries produisant des huîtres creuses au USA (Elston *et al.*, 2008). Par ailleurs, chez la palourde japonaise adulte *Venerupis philippinarum*, *V. tapetis* est décrit comme l'agent étiologique de la maladie de l'anneau brun induisant des mortalités massives (Borrego *et al.*, 1996 ; Allam *et al.*, 2000; Paillard *et al.*, 2006).

Enfin, deux espèces bactériennes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Waechter *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a; Gay *et al.*, 2004b; Garnier *et al.*, 2007) sont impliquées dans des épisodes de mortalité chez l'huître creuse, *C. gigas* (Bilan REPAMO 2012 et 2013). *Vibrio aestuarianus* est une bactérie marine qui a été isolée en Amérique du Nord, en Europe et en Asie où elle provoque des mortalités dans des élevages de poissons. Les souches isolées d'huîtres creuses ou de leur environnement pendant des épisodes de mortalité montrent peu de diversité génétique (Bilan REPAMO 2012 et 2013). Des bactéries appartenant au groupe *Splendidus* et à l'espèce *V. aestuarianus* ont été associées à de nombreux épisodes de mortalité d'huîtres en France (Garnier *et al.*, 2007 ; Saulnier *et al.*, 2010) et la virulence de certaines souches a été démontrée par des infections expérimentales chez *C. gigas* (Gay *et al.*, 2004c ; Garnier *et al.*, 2007).

2. *Ostreid herpesvirus 1*

Des infections par des virus de type herpès ont été identifiées dans diverses espèces de mollusques marins dans le monde, en particulier aux États-Unis, au Mexique, en France, en Espagne, au Royaume-Uni, en Nouvelle-Zélande, en Australie et à Taiwan. La première description d'un virus morphologiquement semblable aux membres de la famille *Herpesviridae* chez un mollusque bivalve a été rapportée en 1972 aux États Unis chez l'huître américaine, *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972).

Depuis 1991, des épisodes de mortalités massives sont observés en France aux stades naissain et larves chez *C. gigas* et *O. edulis*, associés à la détection de virus de type herpès (Comps and Cochenec 1993 ; Renault *et al.*, 1994a et b ; Renault *et al.*, 2000). Ces mortalités sont généralement décrites pendant les périodes chaudes de l'année et sont également rapportées chez d'autres espèces de bivalves, notamment chez la palourde européenne, *Venerupis decussatus*, chez la palourde japonaise, *V. philippinarum*, mais aussi chez la coquille Saint-Jacques, *P. maximus* (Renault *et al.*, 2001 ; Arzul *et al.*, 2001). Les animaux de moins d'un an (larves et juvéniles) semblent être principalement touchés par les infections à herpèsvirus. Les animaux adultes semblent en effet peu ou pas touchés par des phénomènes de mortalité associée aux infections par ces virus. Cependant, ces virus sont détectés à ce stade de développement chez *C. gigas* (Arzul *et al.*, 2002) et chez d'autres espèces de bivalve (Hine & Thorne, 1997). Le pouvoir pathogène du virus infectant les larves d'huître creuse a été confirmé au stade larvaire par des essais d'infection expérimentale (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Le Deuff *et al.*, 1996).

Dans ce contexte, il est apparu indispensable de caractériser plus précisément le virus infectant les huîtres creuses en France et des travaux ont été entrepris dans ce sens. Les résultats obtenus montrent ainsi que les caractéristiques morphologiques des virions, les sites de réplication du virus, la nature de l'acide nucléique viral : ADN double brin de grande taille, l'organisation du génome, la présence de certains gènes (terminase) et la structure fine des capsides sont autant d'éléments qui permettent de conclure qu'il s'agit bien d'un herpèsvirus. Ainsi, les données disponibles laissent supposer que les herpèsvirus de mammifères et d'oiseaux, ceux infectant les poissons et les amphibiens et ceux présents chez les invertébrés formeraient trois familles (Figure 8) au sein d'un même ordre (*Herpesvirales*). Le virus décrit chez l'huître creuse, *C. gigas*, est le premier membre identifié de la troisième

et dernière famille (*Malacoherpesviridae*). Ce virus a été nommé ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Davison *et al.*, 2005 ; Davison *et al.*, 2009).

Si la structure du génome du virus OsHV-1 s'apparente à celle d'HSV-1, l'analyse de son génome laisse apparaître très peu d'homologies avec les autres herpesvirus déjà connus (Le Deuff & Renault 1999 ; Davison *et al.*, 2005). Les comparaisons de séquence n'ont pas permis par exemple d'identifier de protéines virales présentant des homologies avec les protéines de capsides d'autres herpesvirus. De plus, il n'a été possible d'identifier des gènes du virus ayant des homologues chez d'autres herpesvirus que pour un gène codant pour une sous-unité ATPase de la terminase. Cette enzyme est impliquée dans l'empaquetage de l'ADN viral dans la capside. Des gènes homologues sont présents chez tous les herpesvirus et les seuls homologues non herpesvirus sont codés par le phage T4 et des bactériophages apparentés. Les gènes du phage T4 et du virus infectant les larves d'huître ne présentant pas d'intron, alors que leurs homologues chez les herpesvirus de mammifères et d'oiseaux en possèdent un et que deux introns sont observés chez les herpesvirus de poissons et d'amphibiens.

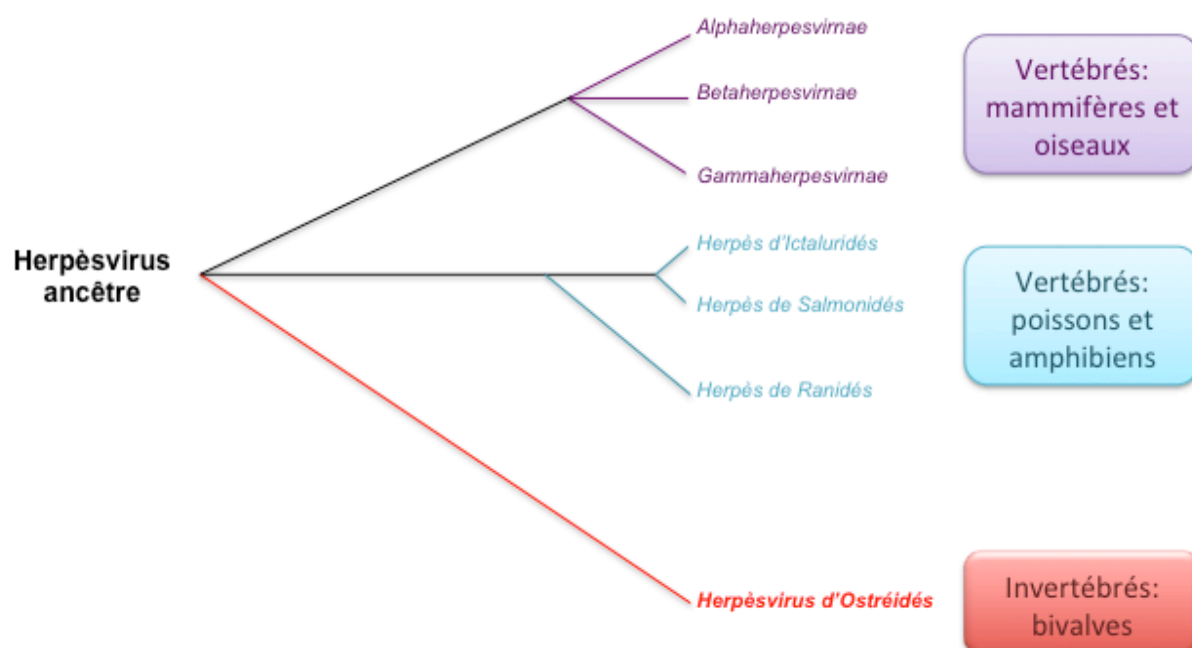


Figure 8. Position proposée du groupe des herpesvirus d'invertébrés au sein de l'arbre phylogénétique des herpesvirus (Davison *et al.*, 2005)

a. Morphologie

OsHV-1 a été identifié comme appartenant à l'ordre *Herpesvirales* et plus précisément à la famille *Malacoherpesviridae* (Davison *et al.*, 2005 ; Davison *et al.*, 2009).

Les particules virales présentant des caractéristiques morphologiques comparables à celles des herpesvirus ont été identifiées chez plusieurs espèces de bivalves marins (Renault & Lipart, 1998 ; Renault *et al.*, 2001 ; Arzul *et al.*, 2001). Les particules virales enveloppées (Figure 9) ont une taille comprise entre 90 et 150 nm. La taille des nucléocapsides varie de 72 à 75 nm. La taille du tégment semble réduite par rapport à la plupart des herpesvirus, mais elle est cependant variable d'un herpesvirus à un autre (Roizman & Furlong, 1974). Les virions observés sont enveloppés et présentent parfois des projections à la surface de l'enveloppe (Renault, 1998).

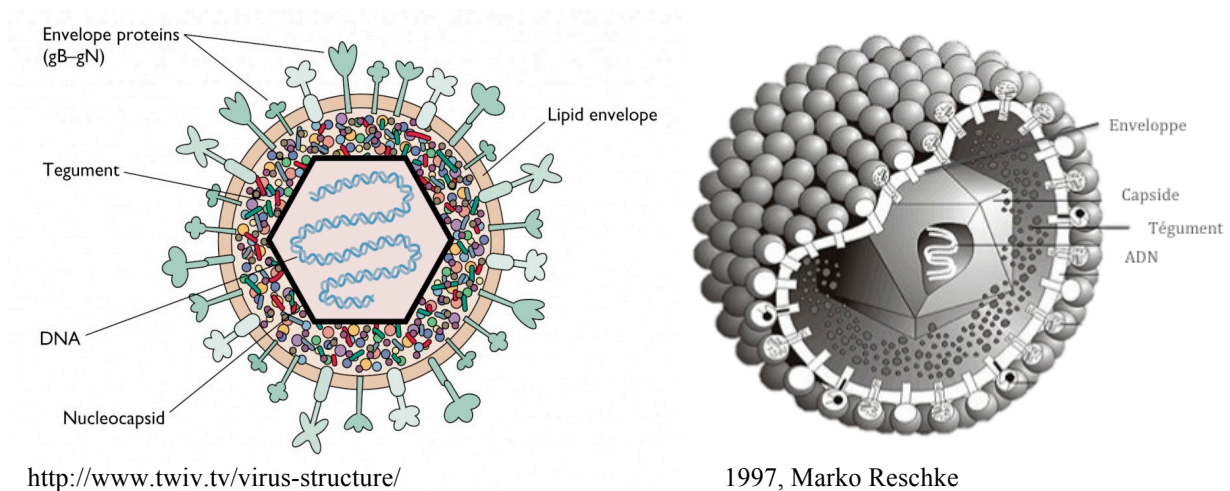


Figure 9. Particules virales des herpesvirus

b. Structure et organisation du génome viral

Le matériel génétique d'OsHV-1 a été extrait à partir de particules virales purifiées (Le Deuff & Renault, 1999). OsHV-1 est un virus à ADN double brin linéaire de 207 kpb avec un pourcentage en G+C faible (39 %) (Davison *et al.*, 2005). Sa structure est comparable à celle de HSV-1, virus humain (*alphaherpesvirus*) dont la structure est de type F. Elle est composée de deux fragments uniques, un long UL et un court US, encadrés chacun par des séquences répétées inversées, TRL et IRL pour le segment UL et IRS et TRS pour le segment US. Une séquence X est située entre IRS et IRL (Figure 10).



Figure 10. Organisation générale du génome de l'*ostreïd herpesvirus 1* (OsHV-1).

Le séquençage du génome de OsHV-1 et les séquences obtenues ont permis d'identifier un certain nombre de gènes et notamment :

- sept gènes codant pour des enzymes : ADN polymérase, désoxyuridine triphosphatase, ribonucléotide réductase, hélicase, terminase et primase.
- sept gènes codant pour des protéines similaires à des protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor Apoptosis Protein : IAP). Considérant le fait que les virus infectant les insectes et les crustacés (*Baculovirus* et *Entomopoxvirus*) codent également pour des IAPs, la voie apoptotique en réponse aux infections virales, semble être privilégiée par les invertébrés. Les herpesvirus et poxvirus des vertébrés ne codent pas pour des IAPs.
- dix gènes codant pour des protéines de membrane qui traversent au moins une fois la membrane. Dix-sept autres protéines présentent un domaine hydrophobe suggérant une possible association avec des membranes.

Une analyse détaillée des séquences a permis d'identifier 136 cadres de lecture (Open Reading Frames, ORF) et 124 gènes codant pour une protéine (Davison *et al.*, 2005; GenBank n° d'accèsion AY509253). En effet, la majorité des ORF identifiés dans le génome codent pour des protéines inconnues (plus de 70 %), ne présentant aucune homologie avec les données existantes dans les banques. Néanmoins, il existe de grandes différences entre les herpesvirus de poissons et ceux des amphibiens ainsi qu'entre les herpesvirus de mammifères et ceux des oiseaux.

L'absence de lignées cellulaires provenant de bivalves marins ainsi que l'échec des essais d'infection de lignées cellulaires hétérologues avec OsHV-1, ne permet pas actuellement d'étudier et d'observer le cycle de réplication du virus *in vitro* (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 1995 ; Deniau, 2000).

c. Diversité du virus OsHV-1

Un variant du virus, dénommé Var, a été rapporté chez différentes espèces de bivalves incluant l'huître creuse, *C. gigas* (Arzul *et al.*, 2001a ; 2001b ; 2001c). Le variant Var est considéré comme appartenant à la même espèce virale.

Plus récemment, un autre variant génotypique, appelé μ Var, a été décrit comme infectant l'huître creuse (Segarra *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2012) en relation avec les phénomènes de mortalité massive observés depuis 2008 en Europe. Segarra *et coll.* (2010) ont défini le variant μ Var, comme présentant des mutations systématiques dans deux régions du génome (ORF4 (24 mutations) et ORF 43 (2 mutations)) par rapport à la séquence du virus de « référence » (n° accèsion AY509253).

Renault *et coll.* (2012) ont mis en évidence une délétion importante de 605 pb dans une autre région du génome (ORF 35/36/37/38), mais également un polymorphisme plus complexe du virus OsHV-1 avec l'existence de plusieurs génotypes (Figure 11).

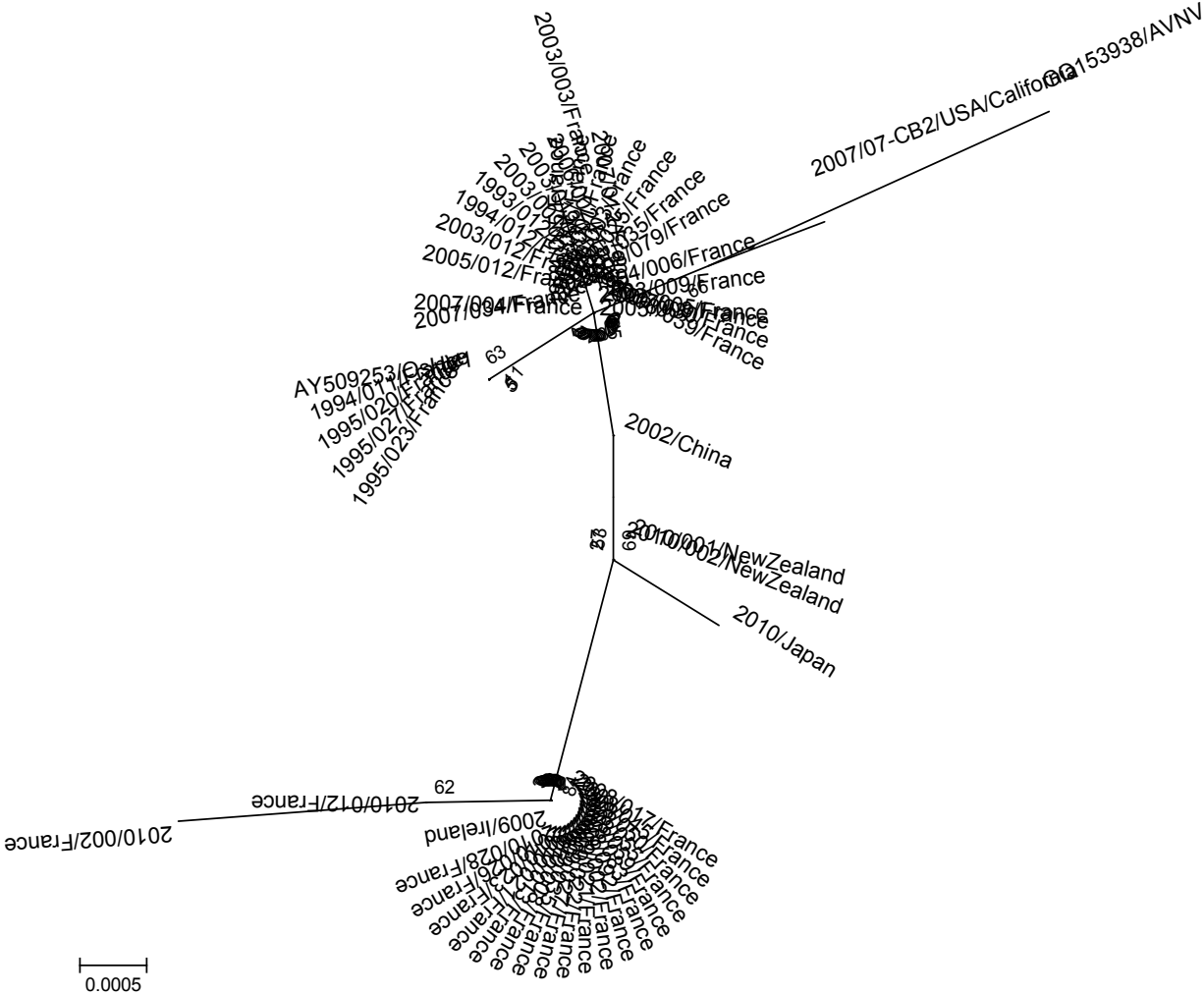



Figure 11. Diversité du virus OsHV-1 (Renault *et al.*, 2012)

IV. Huître creuse, *Crassostrea gigas*

1. Taxonomie et origine

L'huître creuse, *C. gigas*, (décrite par Thunberg en 1793), communément appelée huître du Pacifique ou huître japonaise, est un mollusque bivalve filtreur de la famille des Ostreidae (Tableau 1). Elle appartient à l'embranchement des mollusques qui est l'un des groupes le plus important qui comporte environ 130 000 espèces. Elle appartient également à la classe des bivalves regroupant 12 000 espèces vivantes. Les bivalves, mollusques aquatiques, possèdent une coquille munie de deux valves, articulées entre elles par une charnière et actionnées sous le contrôle de muscles adducteurs.

Tableau 1. Classification de l'Huître creuse, *Crassostrea gigas*

	Classe	Bivalvia
	Sous classe	Pteriomorphia
	Ordre	Ostreoida
	Sous ordre	Ostreina
	Superfamille	Ostreacea
	Famille	Ostreidae
	Genre	<i>Crassostrea</i> (Sacco, 1897)
	Espèce	<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)

Cette huître originaire du Japon a été introduite aux Etats-Unis en 1920, au Portugal, puis en France en 1966 à des fins d'ostréiculture. Elle est présente à l'état sauvage de la surface jusqu'à 80 mètres de profondeur. Cette espèce vit principalement le long des côtes abritées dans des zones de marées en se fixant sur des substrats durs en cimentant une valve. (Sous les mers – <http://fran.cornu.free.fr>). Du fait de sa croissance rapide et sa grande tolérance aux conditions environnementales, l'huître creuse est devenue l'huître la plus utilisée pour la culture dans plusieurs régions du monde. Elle a été introduite pour remplacer les stocks d'huîtres indigènes épuisés par la surexploitation ou les maladies, ou pour créer une industrie là où elle n'existait pas auparavant. Elle est retrouvée le long des côtes bretonnes (Manche, mer d'Iroise), mais aussi en mer du Nord, dans le golfe de Gascogne, en mer Cantabrique et

le long des côtes portugaises. Les méthodes historiques de l'élevage extensif, dépendant des captures des naissains sauvages et leur reparcage dans des zones productives, ont évolué avec le temps pour inclure un éventail de méthodologies en suspension (culture en suspension) et en surélévation utilisant des naissains sauvages ainsi que ceux obtenus en éclosérie. En effet, des développements technologiques récents ont permis la production de naissains en éclosérie et de programmes de sélection.

2. Principaux pays producteurs

La production de l'huître creuse *Crassostrea sp.* représente plus de 99.5 % des Ostréidés (Figure 13). La Chine est le premier producteur avec 81 %, suivie de la Corée du Sud et du Japon. La production de l'huître plate européenne *O. edulis* se maintient aux environs de 4000 tonnes annuelles.

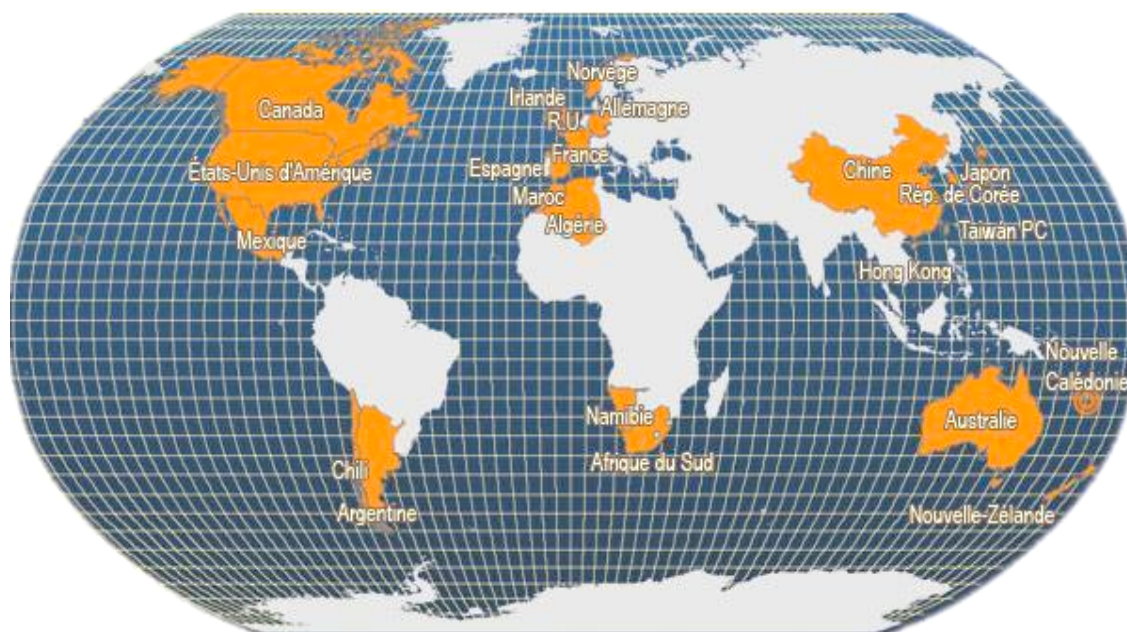


Figure 12. Principaux pays producteurs de *Crassostrea gigas* (Source : Statistiques de Pêches FAO, 2006)

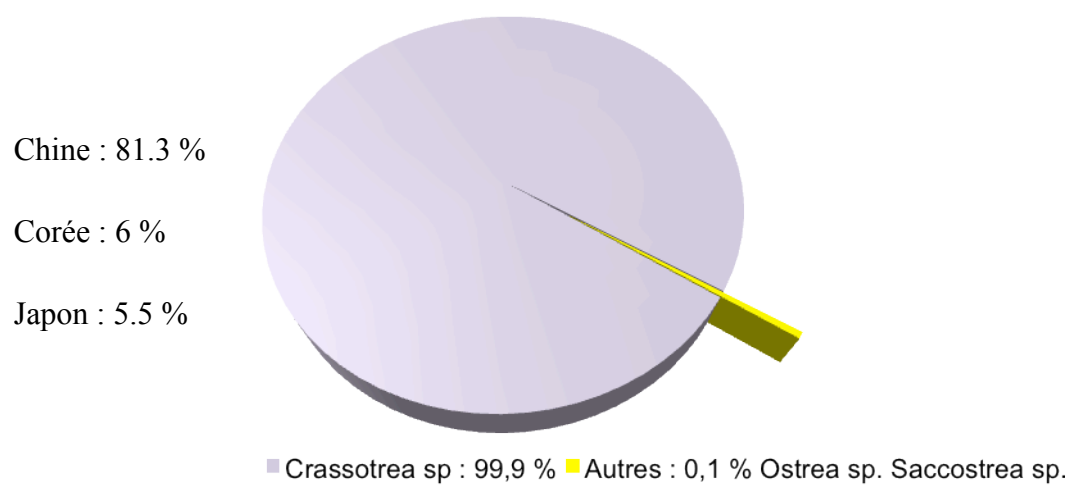


Figure 13. Production par espèce : 4 480 000 tonnes en 2010 (+4.1 % par rapport à 2009) et répartition mondiale (source Ifremer : Aquaculture)

3. Habitat et biologie

L'huître creuse est une espèce plutôt estuarienne, préférant les couches inférieures des substrats solides où elle mène une existence sédentaire attachée aux rochers, aux débris et aux coquilles à partir de la zone intertidale inférieure à 40 m. Cependant, ces huîtres peuvent également être trouvées sur les fonds vaseux et sablo-vaseux. Le niveau optimal de salinité varie entre 20 et 25 ‰ bien que cette espèce puisse se reproduire dans des salinités en dessous de 10 ‰ et survit dans des salinités au-dessus de 35 ‰. Elle supporte également une large gamme de températures oscillant entre 1,8 et 35 °C. Les huîtres creuses sont hermaphrodites protandriques. Dans les zones avec un apport en nourriture suffisant, le sex-ratio chez les huîtres plus âgées montre une prédominance des femelles, tandis que l'inverse est vrai dans les zones pauvres. Les femelles peuvent de nouveau redevenir des mâles si l'apport en nourriture est limité comme par exemple, quand elles sont élevées à très fortes densités.

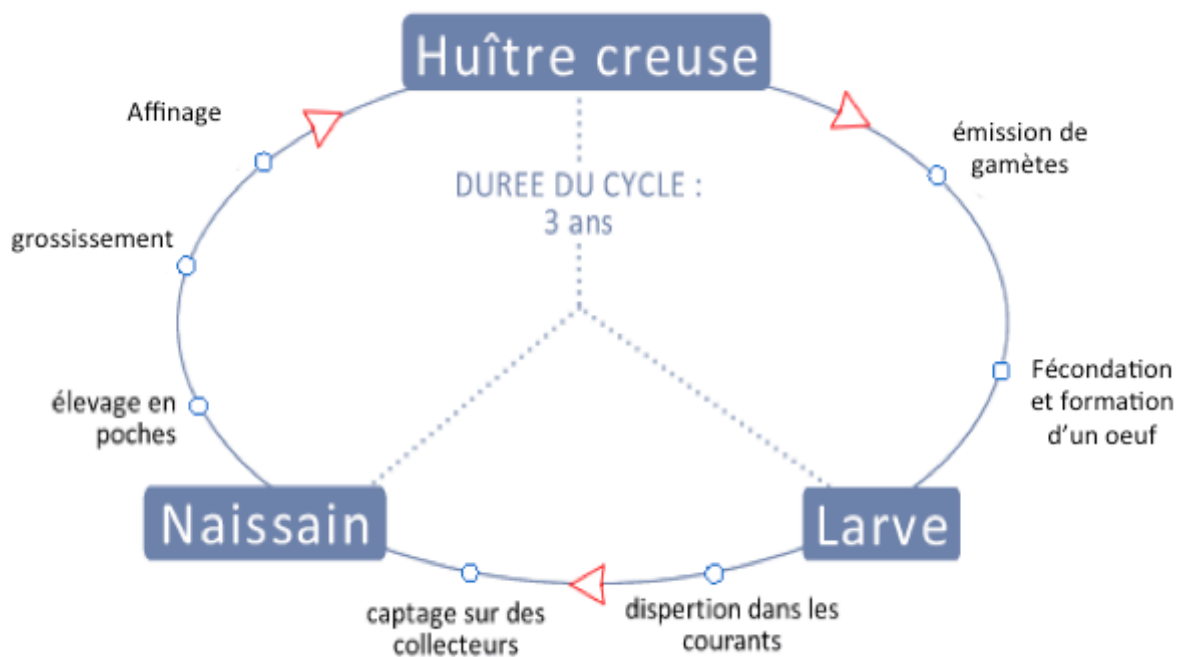


Figure 14. Cycle biologique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

La gamétogenèse commence à environ 10°C et à des salinités allant de 15 à 32 ‰, mais rarement à des salinités plus élevées. La ponte se produit généralement à des températures supérieures à 20°C et rarement entre 15 et 18°C. L'espèce est très féconde avec des femelles de 8-15 centimètres de longueur produisant entre 50-200 millions d'ovocytes lors d'une ponte. Les larves sont planctoniques et sont distribuées dans toute la colonne d'eau (Figure

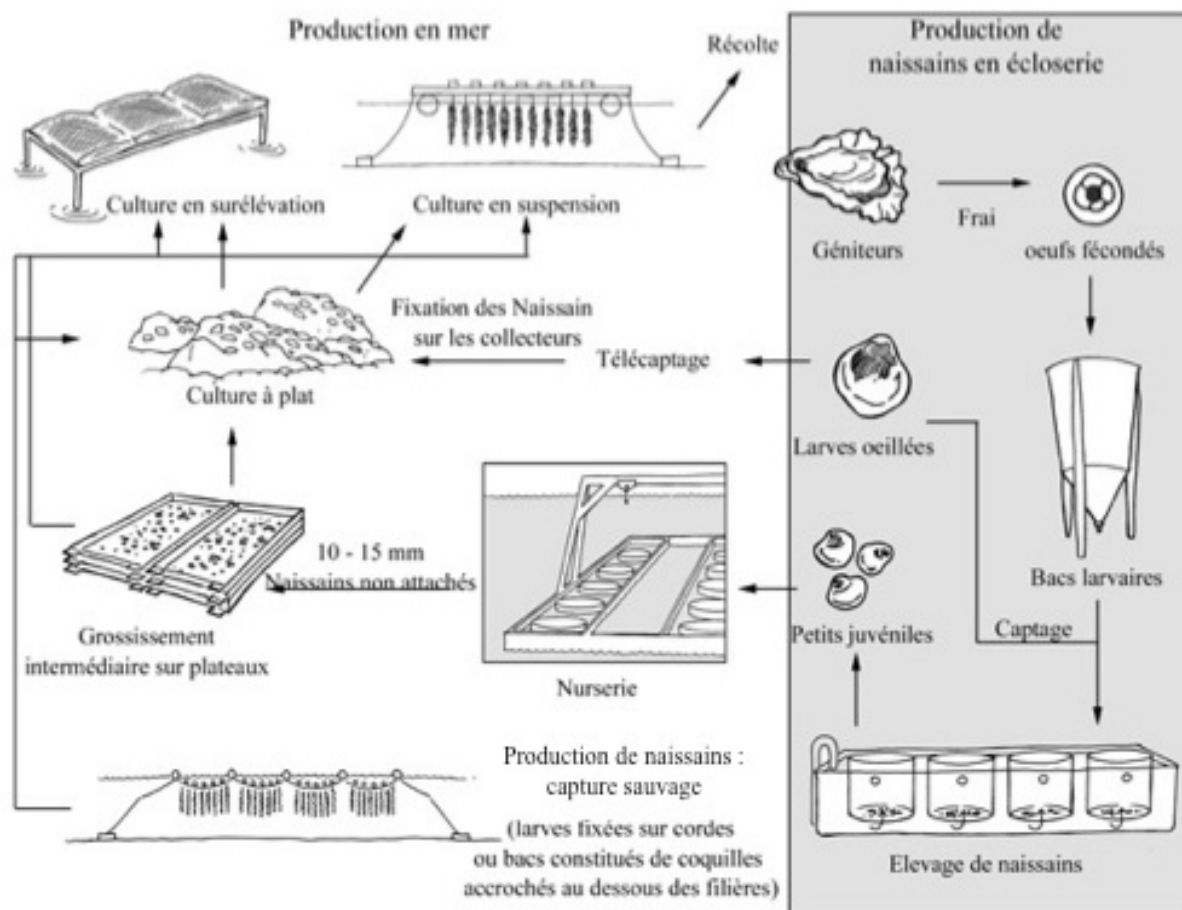


Figure 15. Cycle de production de *Crassostrea gigas*

15).

Elles ont une coquille mesurant 70 µm au stade prodissoconque I - suivant un développement embryonnaire initial - et à 300-340 µm, elles sédimentent dans la colonne d'eau pour ramper, en utilisant le pied larvaire, à la recherche d'un substrat approprié pour se fixer. Cette étape peut durer deux à trois semaines, selon la température de l'eau, la salinité et l'apport en nourriture. Durant cette période, elles peuvent être largement dispersées par les courants. Comme chez d'autres espèces d'huîtres, les larves matures d'huîtres creuses se fixent sur un substrat choisi grâce à la sécrétion d'une sorte de ciment par une glande qui se trouve dans le pied. Une fois fixées, elles se métamorphosent en juvéniles. Dans de bonnes conditions, leur

croissance est rapide et la taille commercialisable est atteinte après 18 à 30 mois (Figure 14 et 15).

4. Cycle de vie

La larve trocophore, est une larve ciliée, qui se déplace en tournoyant sur elle-même. C'est le premier stade larvaire, et elle a une vie pélagique (en pleine eau). La larve D est appelée ainsi car elle a une forme très particulière: elle ressemble à un « D ». Elle possède toujours des cils, mais elle possède également un velum qui lui sert à se déplacer, au même titre que les cils. Ce velum sera totalement formé chez la larve véligère (Figure 16). La larve véligère est toujours pélagique avec un velum complètement formé. C'est lui qui donne son nom à ce stade larvaire. La coquille définitive commence à se former et on peut voir l'apparition de la charnière, qui permettra à l'adulte d'ouvrir ou fermer ses valves. Cette larve est toujours pélagique, et c'est la dernière étape avant la vie benthique (au fond). En plus du velum, il y a apparition du pied (d'où le nom pédivéligère). A la taille d'environ 250 μm , on constate l'apparition d'une tache noire sur la coquille. On l'appelle alors larve oeillée. Cette tache est annonciatrice de la métamorphose. La métamorphose se déroule en deux phases :

- une phase où la larve sédimente sur le fond pour chercher un support ;
- la seconde phase consiste en la fixation définitive de la larve sur son support, support où elle grandira pour devenir naissain, puis huître.

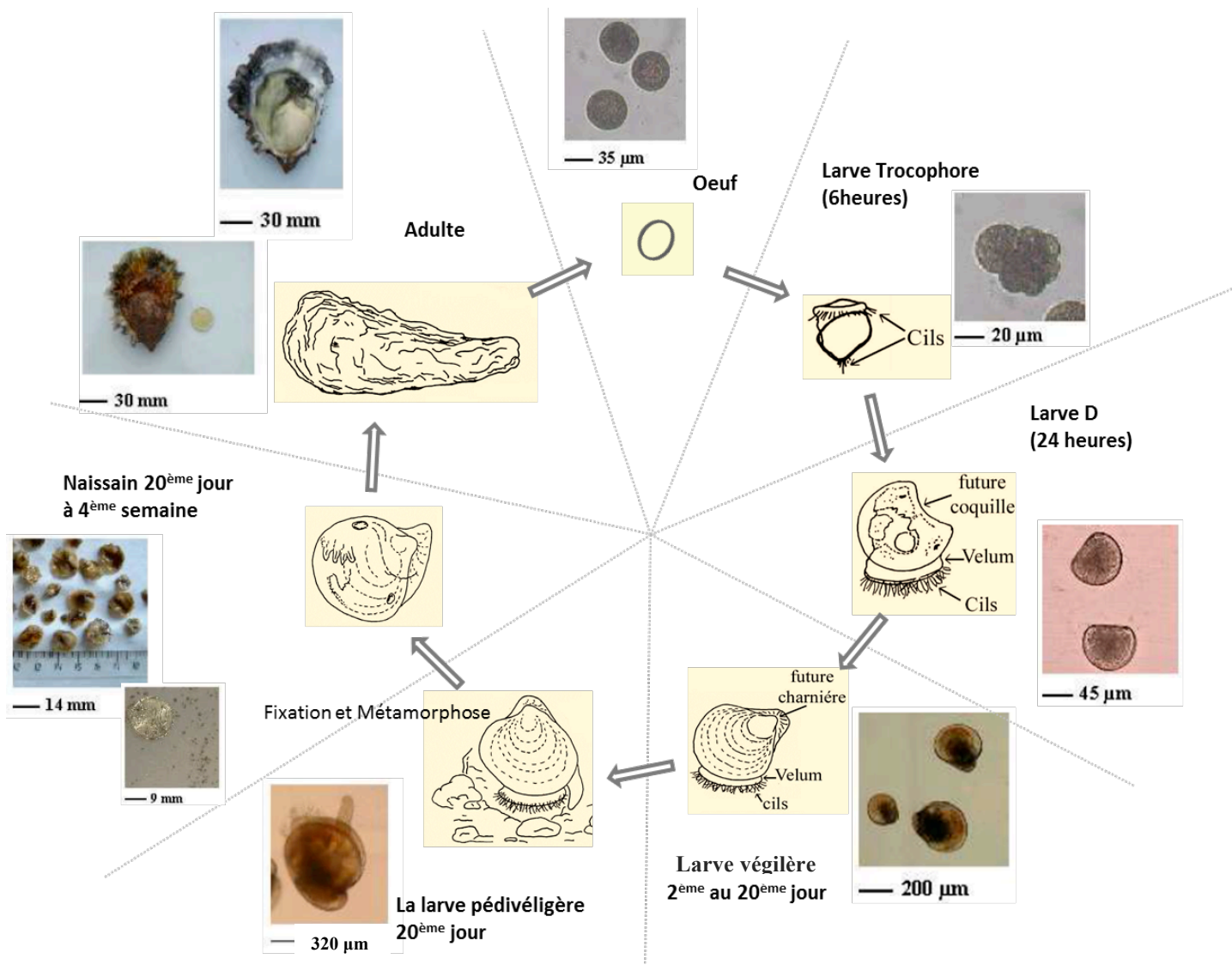


Figure 16. Cycle de vie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

5. Anatomie

L'huître creuse possède une coquille en ovale étroit de couleur mauve ou verdâtre qui peut atteindre 30 cm de long. Cette coquille possède des stries de croissance très marquées qui sont des arêtes grossières concentriques et coupantes. Elle possède deux valves: une valve creuse et profonde et une valve supérieure plate. Cet animal peut s'ouvrir et se fermer grâce à un muscle adducteur unique (Figures 17 et 18). Elle peut ainsi se protéger des prédateurs en maintenant sa coquille fermée, mais aussi lorsqu'elle se retrouve hors de l'eau.

Ce bivalve possède un cœur qui envoie l'hémolymphe vers les branchies afin de s'enrichir en oxygène (Figure 19). Elle possède une glande digestive entourant l'estomac, qui a pour fonction la digestion. Le manteau, constitué de trois feuillets, possédant trois fonctions différentes : (i) le premier feuillet sécrète le carbonate de calcium permettant la formation de la coquille (ii) le deuxième est un palpeur sensoriel (iii) et le troisième ménage une cavité que les branchies séparent en deux chambres : une chambre inhalante et une chambre exhalante (Figure 18). L'huître a la capacité de pomper l'eau de mer afin de capter les particules nécessaires pour son alimentation, mais aussi de capter l'oxygène pour sa respiration.

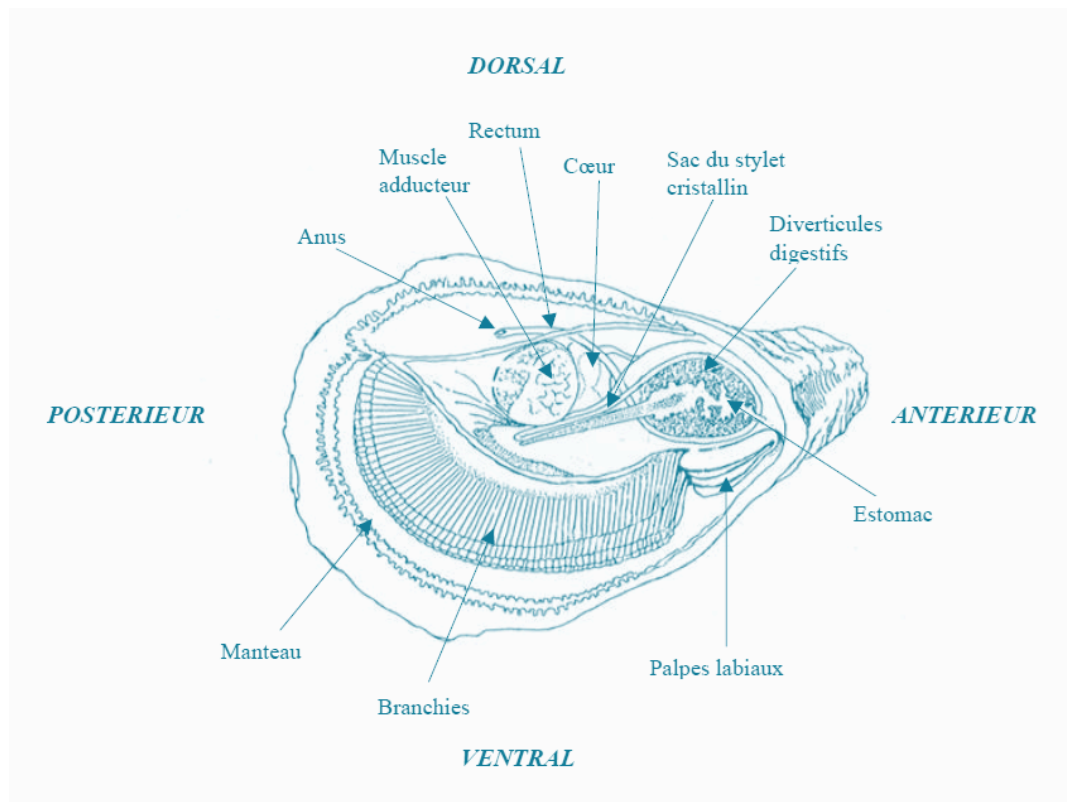


Figure 17. Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (D'après B. Gagnaire 2006)

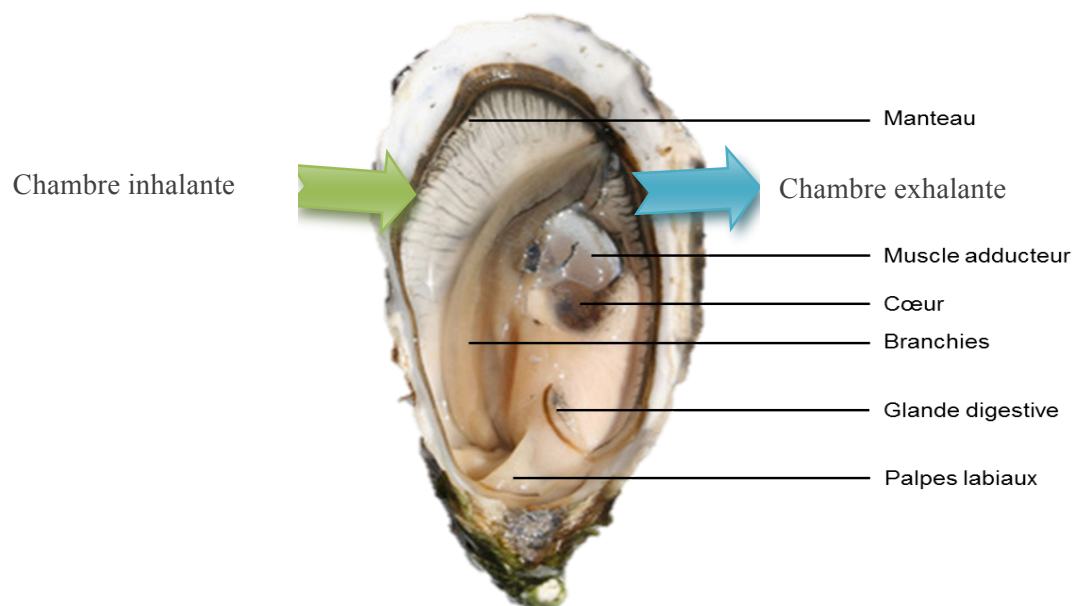


Figure 18. Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Le corps de l'animal est enveloppé dans le manteau dont les deux lobes sont soudés au niveau de la bouche et qui assure la croissance coquillière. Le manteau délimite la cavité palléale. Il enveloppe tous les organes auxquels il est rattaché au niveau du muscle adducteur, de la masse viscérale et des branchies. Sa fonction première est la sécrétion de la coquille. Il assure également des fonctions sensorielles tactiles (terminaisons nerveuses) et visuelles (ocelles et osphradies). Il intervient également dans la nutrition en participant au premier tri des particules extérieures. Il participe au stockage de matériaux de réserve (lipides, glycogène), à la fonction respiratoire, à la dissémination des gamètes et à la défense par la formation de mucus. Il représente l'une des premières barrières vis-à-vis des agressions externes.

Les branchies sont constituées de quatre feuillets lamellés et s'étendent le long du manteau sur la partie dorsale. Elles assurent une double fonction de respiration et de nutrition en collectant les particules de nourriture. Les branchies sont le site de l'absorption de l'oxygène. L'huître ne possédant pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine, l'oxygène est transporté des branchies vers les organes dissous dans l'hémolymphe. Les branchies assurent également la capture des particules alimentaires. La ciliation complexe des feuillets détermine les courants d'eau, la filtration de cette eau (qui est rejetée par un orifice exhalant postérieur) et assure la capture, puis le tri des particules alimentaires qui sont dirigées vers la bouche. L'intensité de l'activité dépend de nombreux facteurs extérieurs (température, salinité) et intérieurs (régulation) déclencheurs. Ainsi, les huîtres filtrent l'eau de mer et en extraient l'oxygène dissout et des éléments nutritifs.

Par sa contraction, le muscle adducteur provoque la fermeture des valves. A l'inverse, son relâchement fait cesser toute activité de résistance permettant l'ouverture de la coquille. Le muscle est composé de deux parties: les deux tiers correspondent à une partie translucide et ovale, appelée partie vitreuse ou noire. Le tiers restant est en forme de croissant blanc opaque. Les fibres de cette partie sont plus résistantes que celles de la partie vitreuse et sont lisses. Le muscle entier est approvisionné en hémolymphe et il existe un sinus entre les deux parties du muscle dans lequel l'hémolymphe est abondante (lieu privilégiée pour ponctionner l'hémolymphe).

La région antérieure du corps est constituée de quatre palpes labiaux de forme triangulaire et d'une bouche. Les palpes labiaux interviennent dans la nutrition lors des phases de tri et de guidage des éléments nutritionnels vers le système digestif et dans l'élimination des pseudo-fécès (Figures 17 et 18).

Les autres constituants de l'appareil digestif sont inclus dans la masse viscérale localisée en partie dorsale et composée d'un estomac muni d'un stylet cristallin qui assure le broyage et une première digestion par la libération d'enzymes, de la glande digestive (diverticules digestifs) au niveau de laquelle se fait la digestion et enfin d'un intestin qui débouche vers l'extérieur par l'anus dans la cavité palléale et par lequel sont éliminés les déchets sous forme de fécès. La glande digestive entoure complètement l'estomac et une partie de l'intestin. En période de reproduction, la gonade se forme autour de cette masse viscérale.

Le système excréteur est constitué de deux parties, l'une située au niveau du péricarde, l'autre localisée sous le manteau et formant le rein. Un canal réno-péricardique relie les deux parties entre elles. Le rein comporte deux lobes néphridiens. La glande péricardiale intervient dans la filtration et l'épuration de l'hémolymphe lors de son transit par le coeur. Les reins sont pairs et s'ouvrent dans le péricarde par un entonnoir cilié auquel fait suite un canal excréteur (Figure 17).

Le système nerveux est symétrique par rapport au plan sagittal. Les cellules neurosécrétrices sont localisées dans les ganglions cérébro-pleuraux supra-oesophagiens, pédieux (à la base de la masse viscérale) et viscéraux (ventralement au tube digestif). Des ganglions moins importants existent en divers endroits du corps. Les sécrétions sont de type aminergique (sérotonine, dopamine) et peptidergique (Figure 17). Le système nerveux de l'huître est peu complexe et difficilement observable: il comprend principalement un grand ganglion situé sous le muscle adducteur et dont la fonction principale est d'assurer la fermeture des deux valves.

Dans la cavité péricardique, entre la masse viscérale et le muscle, se situe le coeur, composé d'un ventricule et de deux oreillettes (Figure 17 et 19). Le ventricule expulse le fluide circulant (l'hémolymphe) vers les aortes antérieure et postérieure. L'hémolymphe circule ensuite dans les artères et artéριοles, puis dans des sinus de tailles variables qui connectent directement les organes à l'hémolymphe. Ce système circulatoire partiellement clos est qualifié de « semi-ouvert ». L'hémolymphe est ensuite épurée dans le rein et circule vers les branchies par les vaisseaux afférents et en ressort chargé en oxygène après hématose. Les vaisseaux efférents ramènent l'hémolymphe jusqu'aux oreillettes.

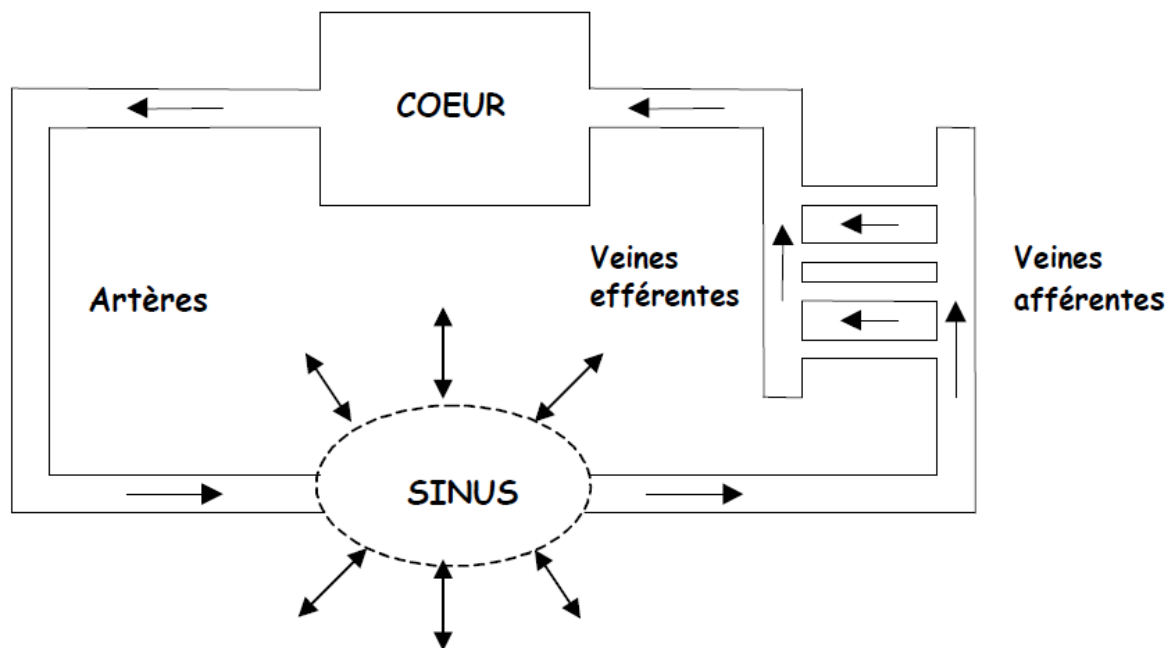


Figure 19. Système circulatoire simplifié chez les mollusques bivalves (modifié d'après Cheng, 1981)

6. Séquençage du génome complet

L'huître creuse, *C. gigas*, appartient à l'un des embranchements les plus riches en espèces, mais peu exploré en matière de génome. Le séquençage et l'assemblage du génome de l'huître creuse ont montré un polymorphisme élevé, des séquences répétitives abondantes et des éléments transposables actifs.

L'étude de son transcriptome a révélé un vaste ensemble de gènes répondant aux conditions de stress. Le grand nombre de gènes codant pour des heat shock proteins (HSP) et des inhibiteurs d'apoptose (IAP) (Figure 20) est probablement au cœur de l'adaptation de l'huître à la vie sessile dans la zone intertidale, un milieu très fluctuant.

Les analyses montrent aussi que la formation de la coquille des mollusques est complexe et implique une large participation des cellules et de leurs exosomes. La séquence du génome de l'huître creuse, *C. gigas*, et des données détaillées du transcriptome fournissent des ressources précieuses pour l'étude de la biologie des mollusques et l'évolution des lophotrochozoaires, et pour l'amélioration génétique des huîtres et d'autres espèces aquacoles importantes.

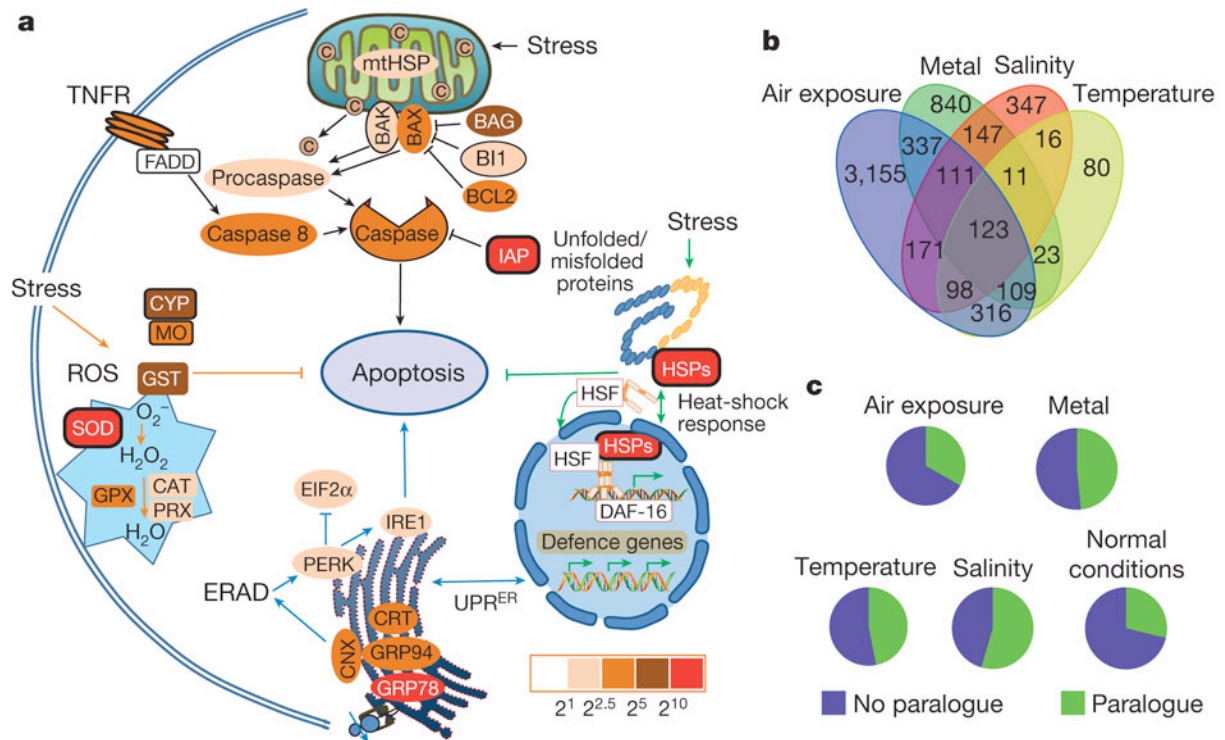


Figure 20. (a) Rôle et expression de gènes clés dans les grandes voies de réponse aux conditions de stress chez *Crassostrea gigas*. (b) Diagramme de Venn des gènes communs et uniques exprimés en réponse à la température, la salinité, exposition à l'air et le stress de métaux lourds (zinc, le cadmium, le cuivre, le plomb et le mercure), montrant le chevauchement des réponses. (c) Nombre de gènes avec et sans paralogues détectables montrent que les gènes répondant au stress sont plus susceptibles d'avoir paralogues ($P < 1 \times 10^{-10}$; χ^2 test). (D'après Zhang *et al.*, 2012).

V. Système immunitaire et mécanismes de défense chez les bivalves

1. Les hémocytes, des cellules à activités multiples

A l'exception des formes les plus primitives (éponges), qui présentent peu de différenciation des organes et des fonctions, la plupart des invertébrés, y compris les mollusques bivalves, possèdent des cellules « sanguines », hémocytes ou coelomocytes, de grande diversité et souvent d'origine incertaine. Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert où circule l'hémolymphe contenant les hémocytes (Figure 21) (Cheng 1981). Les hémocytes peuvent présenter différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et sinus), mais également dans les tissus (hémocytes fixés: glande digestive, manteau, branchies, gonades) (Lorteau *et al.*, 1995 ; Xue & Renault, 2001). Les mécanismes de défense connus à ce jour chez les mollusques bivalves reposent principalement sur les hémocytes.

Chez les mollusques bivalves, une hétérogénéité morphologique et fonctionnelle a été observée au sein des hémocytes. Ainsi, des travaux ont été réalisés pour tenter d'établir une classification des différents types cellulaires. Cheng en 1981 a proposé une première classification. Différents critères (morphologiques, cytochimiques, fonctionnels et moléculaires (antigènes ou récepteurs)) peuvent être utilisés pour classer les hémocytes (Xue, 1998). Les critères les plus utilisés sont les caractères morphologiques qui s'appuient sur la taille, la forme, le rapport nucléo-cytoplasmique, les affinités tinctoriales et la présence d'organites cellulaires observés en microscopie.

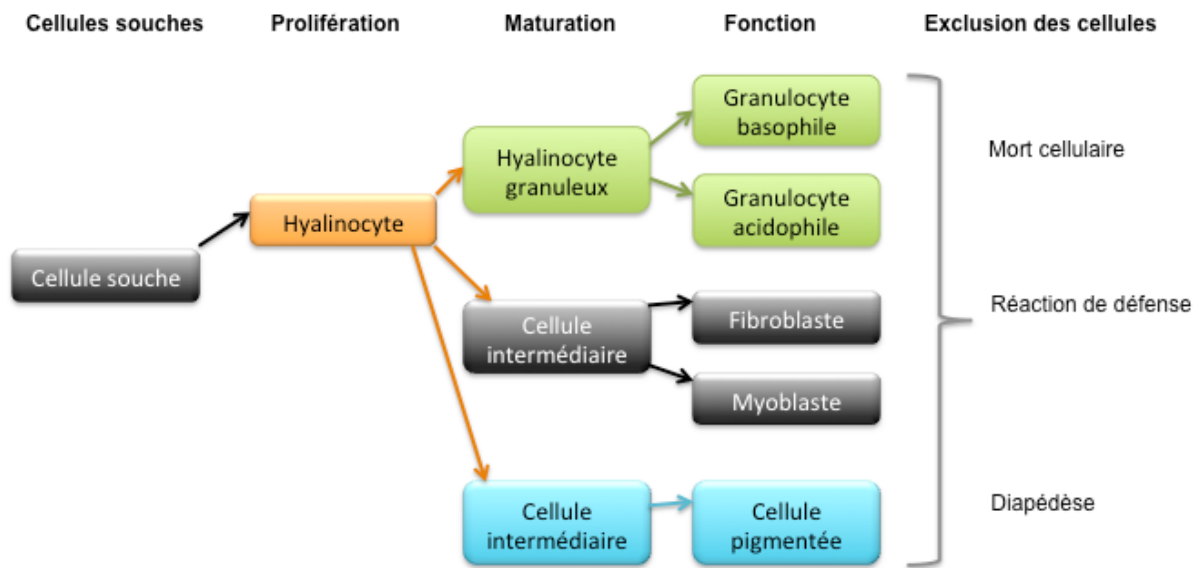


Figure 21. Modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves (d'après Mix, 1976)

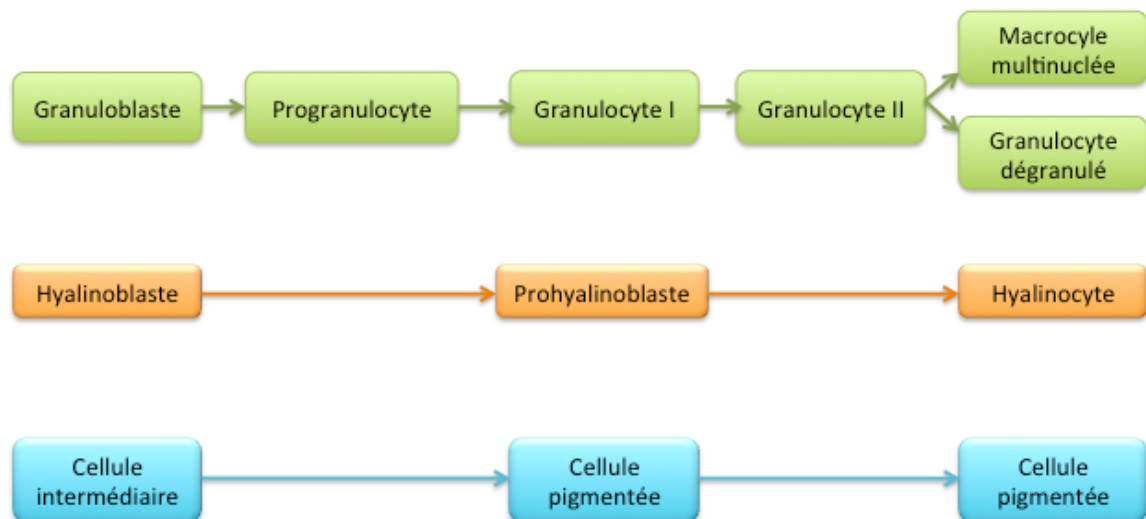


Figure 22. Modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves (d'après Cheng, 1981)

A ce jour, les études s'accordent sur l'existence de deux grandes catégories cellulaires (Hine, 1999) :

Hyalinocytes	Granulocytes
Les hémocytes agranuleux (macrophages, macrophage-like, hyalinocytes, monocyte-like cells, agranulocytes) sont des cellules à rapport nucléo-cytoplasmique élevé, contenant peu ou pas de granulations et qui présentent les caractéristiques de cellules peu différenciées (Figure 23).	Les hémocytes granuleux (granulocytes de différents types) sont des cellules présentant un petit noyau et un cytoplasme abondant caractérisé par de nombreuses granulations (rapport nucléo-cytoplasmique faible) (Figure 24). Les granules peuvent présenter différentes formes, tailles et affinités tinctoriales (Hine, 1999).

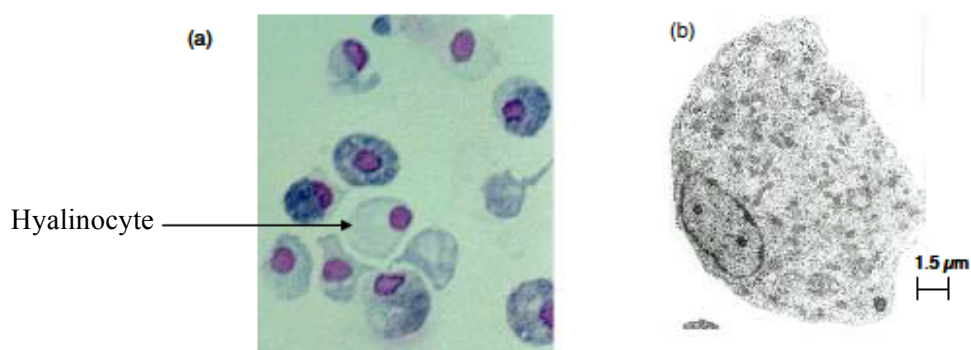


Figure 23. hyalinocyte de l'huître creuse. (a) Observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) (G * 600); (b) Observation au microscope électronique à transmission (d'après B. Gagnaire, 2006).

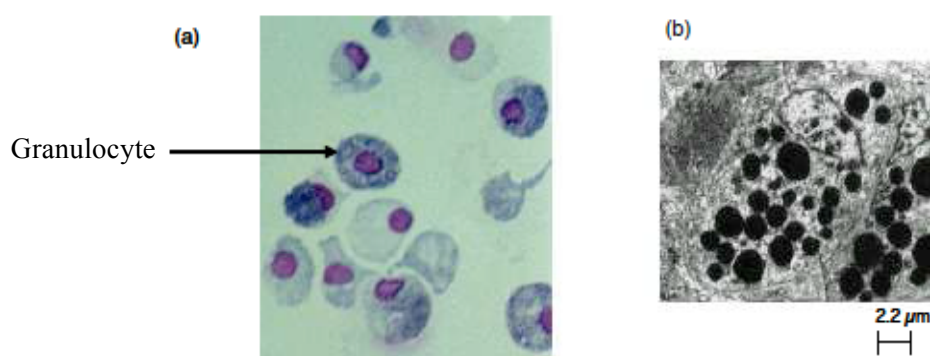


Figure 24. granulocyte de l'huître creuse. (a) Observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) (G * 600); (b) Observation au microscope électronique à transmission (d'après B. Gagnaire, 2006).

Les caractères morphologiques des cellules ne semblent cependant pas suffisants pour établir une classification des hémocytes chez les mollusques. Certains auteurs ont utilisé d'autres critères, tels que des critères fonctionnels (présence d'activités enzymatiques). Chez *V. philippinarum*, les granulocytes et les hyalinocytes possèdent certains enzymes en commun (phosphatase alcaline, estérases non spécifiques, peroxydase et cytochrome C oxydase) alors que certaines activités ne sont détectées que dans les granulocytes (β -glucuronidase, estérases acides et arylsulphatase) (Cima *et al.*, 2000). La présence d'enzymes permet également de différencier les types hémocytaires de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997), de la petite praire, *Chamelea gallina* (Pampanin *et al.*, 2002), de la moule bleue, *Mytilus edulis* (Pipe, 1990a), et de *C. gigas* (Chagot, 1989 ; Xue & Renault, 2000). Des études ont également permis de différencier des sous-populations hémocytaires en utilisant des lectines marquées. Ainsi, les différentes sous-populations hémocytaires de *M. edulis* (Pipe, 1990b ; Wootton *et al.*, 2003b) et de la coque commune, *Cerastoderma edule*, et du couteau-silique, *Ensis siliqua*, fixent différentes lectines (Wootton *et al.*, 2003b).

La cytométrie de flux est un outil qui permet également de différencier les populations hémocytaires chez les mollusques bivalves sur des critères de taille et de complexité (Fisher & Ford, 1988 ; Ford *et al.*, 1994 ; Xue *et al.*, 2001 ; Soares-da-Silva *et al.*, 2002 ; Hégaret *et al.*, 2003a, b ; Gagnaire *et al.*, 2003 ; Gagnaire *et al.*, 2004 ; Goedken & De Guise, 2004). Cet outil peut être utilisé également pour analyser le marquage de certains hémocytes par des anticorps (Renault *et al.*, 2001 ; Xue & Renault, 2001). Différentes populations hémocytaires ont également pu être séparées en gradient de centrifugation chez *O. edulis* (Xue *et al.*, 2000) et par élutriation centrifuge chez *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1990).

Les différents types hémocytaires n'existent pas à tous les stades du développement. Ainsi il est important de noter qu'aucun granulocyte n'a été observé chez les larves de *O. edulis*, alors qu'ils existent chez le naissain et l'adulte (Xue *et al.*, 2001).

2. Propriétés des hémocytes

a. Agrégation hémocytaire

L'agrégation des hémocytes est dite spontanée (en absence d'agents pathogènes) et a lieu lorsque des conditions stressantes apparaissent, particulièrement *in vitro*. En général, le contact avec des objets ou l'agitation mécanique peuvent servir de stimulus (Auffret and Oubella 1997). Par exemple, lorsque l'hémolymphe est ponctionnée à l'aide d'une seringue,

les cellules tendent à s'agréger (Fisher, 1986). La formation d'amas hémocytaires peut se rapprocher du phénomène de coagulation sanguine chez les vertébrés. Cependant, à l'inverse des vertébrés, ce processus est réversible. La plupart des cellules présentes dans les amas peuvent se dissocier et retourner dans la circulation générale (Feng 1988). L'agrégation permet la cicatrisation de plaies ou l'immobilisation de corps étrangers.

Deux phases se distinguent dans le déroulement du phénomène d'agrégation chez la moule californienne, *M. californianus* (Chen & Bayne, 1995). Lors de la première étape (agrégation dite faible), les hémocytes changent de forme et s'agrègent très rapidement (moins d'une minute) après le prélèvement. Cette phase est indépendante des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les amas formés sont peu denses et facilement dissociables. La seconde phase (agrégation dite cohésive) apparaît environ dix minutes après la première phase. Elle dépend des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les amas formés sont beaucoup plus denses que lors de la première phase. Ce phénomène est lié à la formation de filopodes. Certaines substances permettent d'inhiber ce phénomène chez *C. gigas* (EDTA, caféine) (Auffret & Oubella 1997).

b. Plasticité, mobilité et adhésion

La forme des hémocytes circulants chez les mollusques est généralement sphérique. Cependant, lorsque les hémocytes rentrent en contact avec un support, ils prennent une forme amoeboïde et émettent des filopodes. Dans des conditions normales, le processus de dispersion est réalisé en 10-15 minutes et les cellules deviennent alors mobiles (Fisher, 1986). Les hémocytes peuvent présenter la capacité de se déplacer par la formation de prolongements cytoplasmiques (pseudopodes) après étalement. La mobilité cellulaire ne se produit pas tant que les hémocytes n'ont pas pris leur forme amoeboïde. Il apparaît que les microtubules et les microfilaments sont nécessaires pour la locomotion, étant donné que la colchicine et la cytochalasine B, inhibiteurs de la formation des microtubules, inhibent cette migration (Fisher, 1986). En ce qui concerne l'adhésion, elle correspond à une interaction entre la surface des cellules et les substrats, notamment les bactéries. L'adhésion est distincte de l'agrégation et ces deux phénomènes n'interviennent pas simultanément. L'adhésion est induite par des molécules présentes à la surface des cellules, comme par exemple des lectines.

c. Chimiotactisme

L'orientation du déplacement cellulaire est primordiale dans les phénomènes de défense, notamment pour la localisation et la capture de particules étrangères. Les hémocytes de mollusques, à l'instar des leucocytes de vertébrés, peuvent être attirés par des substances produites par les organismes étrangers ou par le mollusque lui-même. Les particules attractives peuvent être des molécules trouvées dans la paroi des bactéries (Fisher, 1986). Le chimiotactisme pourrait être assimilé à un phénomène empêchant la dissémination des infections. Il n'est observé chez l'huître creuse américaine, *C. virginica*, qu'en présence de bactéries vivantes (Cheng & Rudo, 1976).

3. Fonctions des hémocytes

a. Réparation des blessures et de la coquille

Les phénomènes d'agrégation et d'adhésion des hémocytes chez les bivalves sont considérés comme essentiels dans les phénomènes de réparation des blessures. La première étape de la réparation des blessures est l'infiltration hémocytaire sur le site de la blessure. Les hémocytes forment un « bouchon hémocytaire » ou clou hémostatique qui permet de limiter les pertes d'hémolymphe et la pénétration de germes (Cheng, 1988b). Les cellules lésées sont ensuite remplacées par des hémocytes qui se différencient en cellules fusiformes (Sparks & Morado, 1988). Du collagène est ensuite déposé entre les cellules du clou hémostatique. Enfin, les débris de tissus nécrotiques sont éliminés par les hémocytes. La dernière étape est la restauration de l'architecture du tissu (Cheng 1981 ; Feng 1988). Les hémocytes jouent également un rôle dans la réparation de la coquille. Ils migrent à la surface du manteau dès les premiers stades de la réparation (Fisher, 1986) et vont transporter du calcium et des protéines sur le site de la blessure, indispensables à la réparation de la coquille (Cheng, 1996).

b. Digestion, transports de nutriments et excrétion

Le rôle des hémocytes dans la digestion et le transport de nutriments est difficilement dissociable des activités de défense (Cheng, 1996). Les hémocytes sont capables d'endocytose (internalisation de fluides et de particules à l'intérieur de la cellule). Les hémocytes peuvent migrer dans le tube digestif pour internaliser les particules nutritives et relarguer ensuite les nutriments dans les tissus. Les hémocytes sont également capables de

réaliser le phénomène inverse, c'est-à-dire de capturer du matériel indésirable dans l'hémolymphe et le transporter vers le tube digestif pour l'évacuation sous forme de fèces.

L'endocytose est un phénomène général qui regroupe la phagocytose et la pinocytose, ces deux phénomènes existant chez les hémocytes d'huître (Fisher, 1986). La fonction excrétrice des hémocytes est liée aux glandes péricardiques, qui se trouvent au niveau des oreillettes et du manteau. Ces glandes sont le site de production des cellules brunes ou séreuses. Ces cellules pigmentaires doivent leur coloration à des globules cytoplasmiques bruns. Elles sont de forme amoeboïde et sont capables de phagocytose, ce qui laisse suspecter qu'elles pourraient être des hémocytes modifiés. La fonction la plus importante des cellules brunes est leur rôle dans l'élimination des produits de dégradation. Le nombre de ces cellules séreuses augmente lors d'une infection parasitaire chez *C. virginica* (Cheng, 1981).

c. Détoxification des polluants

Les hémocytes des mollusques bivalves jouent un rôle important dans la détoxification des polluants, notamment des métaux lourds (Lorteau *et al.*, 1995) tels que le zinc, le cuivre, le fer et le plomb qui peuvent être piégés dans les hémocytes chez *O. edulis* (Coombs & George, 1977). Chez *M. edulis*, les métaux sont piégés dans les granules des cellules des branchies et du rein (George *et al.*, 1982). Les métallothionéines interviennent dans ce phénomène. Ensuite, les métaux sont relargués dans la circulation, réabsorbés par les hémocytes et finalement excrétés (Coombs & George, 1977 ; George & Pirie, 1980). Le cuivre et le zinc s'accumulent également dans les lysosomes des hémocytes de *C. gigas* (Thomson *et al.*, 1985).

4. Les mécanismes de défense

La fonction principale du système immunitaire chez l'ensemble des animaux est en particulier de fournir une protection contre les agents infectieux (parasites, bactéries, virus et champignons) et de rejeter les composants du non-soi. Chez les vertébrés, un ensemble de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes communiquent entre elles par l'intermédiaire de molécules messagers pour créer un système immunitaire multi-fonctionnel. Les fonctions de ce système permettent d'une part des réponses rapides (défense innée) et d'autre part des réponses spécifiques (défense acquise) par le biais d'un mécanisme de mémorisation des rencontres précédentes avec des antigènes étrangers. Ce second type de réponse possède une efficacité accrue en ciblant un agent infectieux particulier (Feng, 1988). Le phénomène de mémoire immunitaire fait intervenir les lymphocytes. Ce mécanisme est possible du fait de la présence de récepteurs spécifiques portés à la surface de cette catégorie de cellules. Les réponses immunitaires innées sont réalisées par les cellules spécialisées (phagocytes mononucléaires, granulocytes, etc), qui peuvent reconnaître le corps étranger et répondre par la phagocytose et l'inflammation. Les réponses immunitaires innées peuvent également reposer sur une voie de défense cellulaire comme l'autophagie, qui intervient dans l'immunité innée en réponse à certains agents pathogènes (cf. Section V-6-c).

Le système immunitaire chez les invertébrés repose uniquement sur les défenses innées qui sont portées par les traits inhérents anatomiques, physiologiques, biochimiques et comportementaux d'un individu. Il est donc dépourvu d'un phénomène de mémoire comme il peut exister chez les vertébrés (Cheng, 1981). En effet, ces organismes sont dépourvus de lymphocytes et d'anticorps. Ils sont donc considérés comme ne possédant pas de réponse immunitaire adaptative. Cependant, il existe un mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi (Galloway & Depledge, 2001). Les invertébrés possèdent des protéines de reconnaissance de motifs du non soi, les Pattern Recognition Protein (PRP), qui sont capable de reconnaître des motifs présents à la surface des microorganismes, les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP). La reconnaissance des PAMP par les PRP induit l'activation de la réponse immunitaire innée. Plusieurs PRP connues chez les vertébrés ont été identifiées chez des mollusques comme *C. gigas*. Chez cette espèce, ont été caractérisées :

- des protéines de reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif telles que la *Crassostrea gigas* LPS-binding protein (Cg-LBP) et la Bactericidal/Permeability Increasing protein (Cg-BPI) (Gonzalez *et al.*, 2005).

- des protéines de reconnaissance des sucres appelées lectines, telles que les gicalines E et H (Olafsen *et al.*, 1993). Les lectines sont des glycoprotéines produites par les hémocytes capables de se lier à la surface des micro-organismes. Ces lectines peuvent intervenir comme récepteurs dans la reconnaissance des motifs présents sur les algues ou sur les agents infectieux (bactéries, parasites et virus) (Tasumi & Vasta, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). Les lectines jouent un rôle clé dans la phagocytose, puisqu'elles permettent l'agglutination des micro-organismes et facilitent la liaison entre agents infections et cellules immunitaires par leur rôle opsonisant.

Chez d'autres espèces d'invertébrés, des protéines de reconnaissance de peptidoglycanes des bactéries Gram positif appelées peptidoglycanes recognition proteins (PGRP) ont également été rapportées (Yoshida *et al.*, 1996).

Les mécanismes connus à ce jour chez les mollusques bivalves reposent essentiellement sur les hémocytes et différents types d'activité :

- ✓ **infiltration** : suite à une infection, à un dommage causé par des substances toxiques ou à une blessure, une élévation de la densité hémocytaire (ou hémocytose) a lieu dans le système circulatoire. Les hémocytes sont ensuite véhiculés par l'hémolymphe vers le site affecté, dans le but de s'agréger et de limiter l'infection ou la lésion.
- ✓ **encapsulation** : les agents pathogènes de grande taille, tels que les trématodes ou les cestodes, sont entourés d'une couche cellulaire (Figure 25). La formation des capsules d'origine hémocytaire a été étudiée chez l'huître *C. virginica* (Cheng, 1996) et les palourdes *V. decussatus* (Montes *et al.*, 1995) et *M. mercenaria* (Smolowitz *et al.*, 1998), mais aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance chez *C. gigas*.
- ✓ **phagocytose** : la phagocytose contribue à l'élimination d'éléments de petite taille. La première étape de la phagocytose est la reconnaissance des particules étrangères par des PRP à la surface des hémocytes (Bayne, 1990). Ces phénomènes ont été observés pour les hémocytes de plusieurs espèces de mollusque (Cheng, 1981). La phagocytose est un processus visant à éliminer les corps étrangers tels que bactéries, protozoaires et virus. Elle peut se décomposer en quatre étapes principales (Cheng, 1981; Auffret, 1985 ; Fisher, 1986) (Figure 25) :

1. *la reconnaissance* : la rencontre entre les hémocytes et les particules étrangères peut se produire passivement ou activement par chimiotactisme. Les hémocytes sont alors dirigés vers la particule à phagocyter. Cette reconnaissance se fait à l'aide de récepteurs et de lectines (Figure 25).
2. *l'attachement* : les particules se fixent sur la membrane externe avant d'être internalisées (Figure 25).
3. *l'internalisation* : elle est réalisée au travers de la formation d'un phagosome qui résulte d'une invagination de la membrane externe de l'hémocyte. Le phagosome fusionne avec les lysosomes afin de former un phagolysosome. Lors de cette formation, le lysosome libère les enzymes lysosomales dans le phagosome (Figure 25).
4. *la destruction des particules et l'exclusion des particules* : la destruction des particules repose sur les enzymes lysosomales et par la formation d'espèces oxygénées réactives de l'oxygène. Les particules sont dégradées, puis éliminées par exocytose (Figure 25).

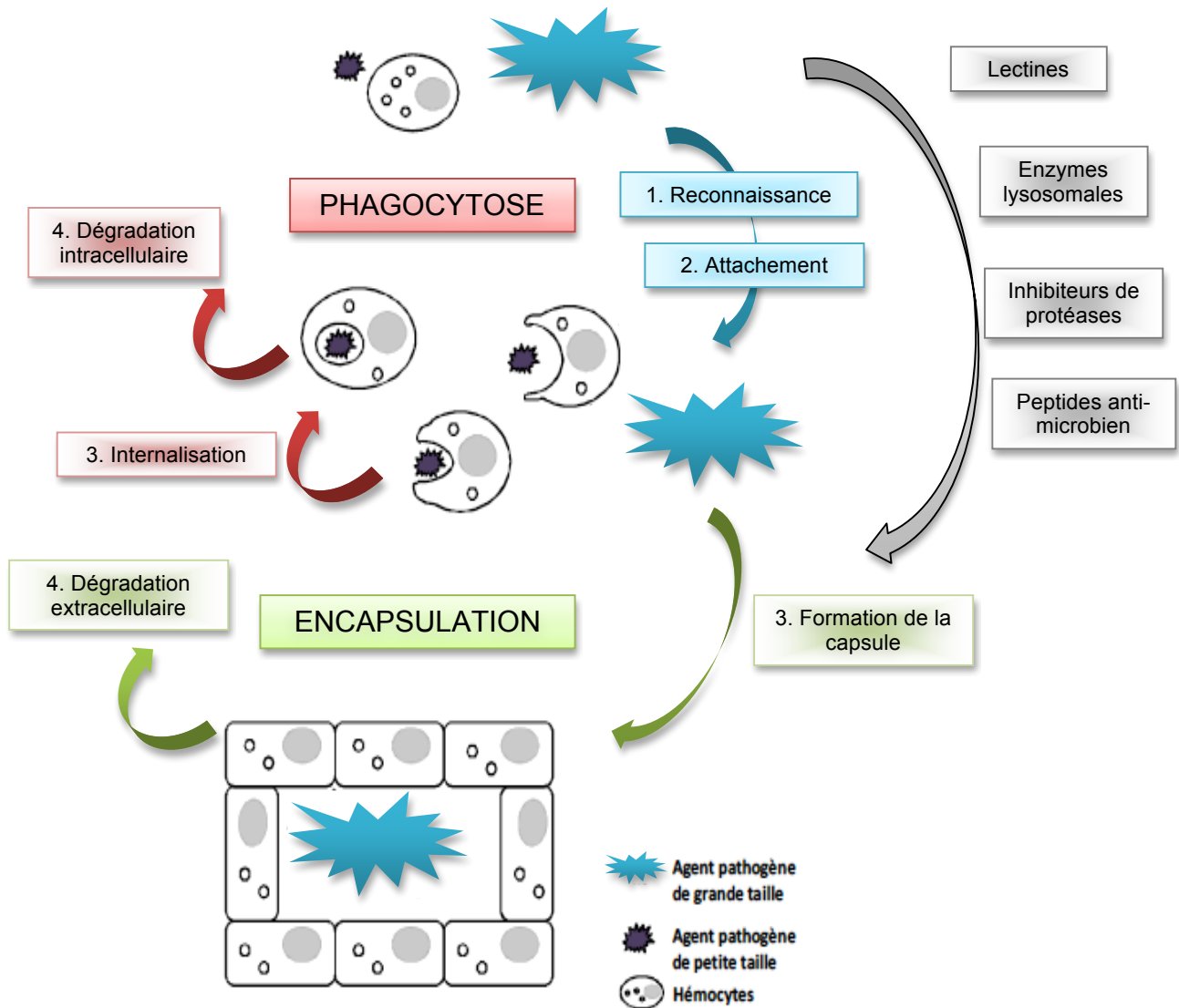


Figure 25. Mécanisme général de la phagocytose et de l'encapsulation

Des études portant sur la phagocytose ont permis de montrer que les types hémocytaires (hyalinocytes et granulocytes) présents dans l'hémolymphe ne possédaient pas les mêmes capacités de phagocytose. Les granulocytes seraient les cellules les plus actives dans le processus de phagocytose du fait de la présence des granules (lysosomes) contenant des enzymes hydrolytiques (Cheng, 1981, 1983, 1990 ; Moore et Gelder, 1983 ; Auffret, 1985 ; Pipe, 1990). L'implication de ce type cellulaire dans la phagocytose serait également liée à des déplacements cellulaires plus rapides (McCormick-Ray & Howaerd, 1991).

D'autres processus cellulaires semblent jouer également un rôle important dans la réponse immunitaire chez *C. gigas* :

Un phénomène d'apoptose a été observé chez *C. gigas* lors d'infections, en particulier virales, pouvant permettre de limiter la progression de la maladie (Renault *et al.*, 2000 ; Sunila & LaBanca, 2003).

Des séquences présentant de fortes homologues avec des protéines intervenant dans les processus de contact, d'adhésion, de communication cellulaire et d'amplification de la réponse immunitaire chez les vertébrés telles que les intégrines et les cytokines de mammifères ont également été identifiées chez *C. gigas*, mais aucune activité fonctionnelle n'a été démontrée jusqu'à présent (Gueguen *et al.*, 2003 ; Tanguy *et al.*, 2004). Chez les invertébrés, la dégranulation des hémocytes permet de libérer des protéines intervenant dans les mécanismes de défense telles que les agglutinines, les péroxinectines, des enzymes cytolytiques, les enzymes du système pro-phénoloxydase (proPO) et les peptides antimicrobiens dans l'hémolymphe ou sur le site de l'infection ou de la blessure (Luna-Gonzalez *et al.*, 2003 ; Hellio *et al.*, 2007 ; Thomas-Guyon *et al.*, 2009).

Des séquences de molécules cytotoxiques de type transferrine et lactoferrine sont présentes dans les banques EST d'hémocytes de *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2003). Un peptide antimicrobien de type défensine, Cg-def, a été identifié chez l'huître creuse, *C. gigas*, et est principalement exprimé au niveau du bord du manteau (Gueguen *et al.*, 2003 ; Gonzalez 2005). Certains auteurs ont également mis en évidence chez cette espèce la présence de molécules et de mécanismes antiviraux (Bachère *et al.*, 1990 ; Olicard *et al.*, 2005).

Des enzymes hydrolytiques (lysozyme, β -glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, sérine protéase, amylase, lipase) sont présentes sous forme libre dans l'hémolymphe ou bien sont contenues dans les granules des hémocytes et sont impliquées dans la lyse intra- ou

extracellulaire (Xue & Renault, 2000). Les enzymes hydrolytiques sont notamment impliquées dans la dégradation des organismes infectieux et jouent un rôle important chez les bivalves marins du fait de leurs multiples activités (Xue & Renault, 2000). La présence extracellulaire des enzymes hydrolytiques lysosomales résulterait d'une dégranulation des granulocytes durant la phagocytose (Cheng, 1981). Les activités lysosomales ont largement été étudiées chez les mollusques bivalves marins (Moore & Gelder, 1985 ; Beckmann *et al.*, 1992 ; Toreilles *et al.*, 1997 ; Xue & Renault, 2000).

Lorsqu'un agent pathogène est phagocyté, l'activation du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'activation de la NADPH-oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase) membranaire conduit à une augmentation de la consommation d'oxygène et à la surproduction de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\cdot), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (O) ou l'anion hypochlorite (ClO^-). Les ROS ont de forts pouvoirs microbicides et sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior, 1984). Le contenu en ROS dans l'organisme est régulé par des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Neumann *et al.*, 2001). Chez *C. gigas*, un effet inhibiteur des capacités oxydatives a été mis en évidence après incubation des hémocytes avec des produits extracellulaires de *V. aestuarianus*, révélant un effet cytotoxique des bactéries (Labreuche *et al.*, 2006).

L'oxyde nitreux synthase ou NO synthase catalyse la production d'oxyde nitreux qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien et anti-tumoral (Arumugan *et al.*, 2000). L'oxyde nitreux combiné avec les anions superoxyde produits lors de la phagocytose génère l'anion peroxynitrique ($ONOO^-$), composé labile, fortement toxique. Ce système de défense a été décrit chez *C. gigas* (Arumugan *et al.*, 2000).

Les protéines de stress (HSP) permettent d'accroître la capacité des cellules à supporter les variations de l'environnement, telles que la température ou la salinité (Boutet *et al.*, 2003), et interviennent également lors de blessures, infections et expositions à des molécules toxiques (Choi *et al.*, 2008). Ces protéines sont des protéines chaperones qui permettent l'élimination des molécules dégradées. Elles ont été retrouvées chez les bivalves marins (Boutet *et al.*, 2003) et participent à leurs mécanismes de défense (Tirard *et al.*, 1997 ; Lacoste *et al.*, 2001).

La synthèse de ces protéines permet aux cellules de supporter les variations environnementales et elles ont été détectées chez *C. gigas* dans les branchies et la glande digestive (Boutet *et al.*, 2003).

Les inhibiteurs de protéases évitent l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes telles que celles des protéases à sérines (ou sérine protéases), intervenant dans l'activation du système proPO. Ils peuvent aussi agir comme des effecteurs directs des mécanismes de défense, en inhibant des protéases permettant aux agents pathogènes de pénétrer et de proliférer dans l'hôte (e.g., les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP); Montagnani *et al.*, 2001). Des ADNc codant pour des protéines de type α -2-macroglobuline, des serpins et des TIMP ont été rapportées chez l'huître creuse, *C. gigas* (Faisal *et al.*, 1998 ; Gueguen *et al.*, 2003).

Chez les invertébrés, la phénoloxydase (PO) est présente sous une forme inactive, prophénoloxydase (proPO). Le système proPO correspond à la cascade biochimique responsable de l'activation des PO (Söderhäll & Cerenius 1998). Certains PAMP peuvent stimuler le clivage protéolytique de la pro-PO en PO (Figure 26). Suite à l'activation de la PO, cette enzyme catalyse l'oxydation de différents composés, principalement phénoliques, en quinones. Ces molécules peuvent à leur tour être polymérisées de façon non enzymatique en mélanine (Figure 26). Le mécanisme d'activation du système proPO chez les invertébrés a été comparé à d'autres mécanismes d'activation de cascades impliquées dans les mécanismes de défense telles que la cascade Toll, présente chez de nombreux invertébrés, ou la cascade de coagulation du sang et le système du complément chez les mammifères (Alan *et al.*, 1998). Chez *C. gigas*, une activité PO a été détectée dans l'hémolymphe (Luna-González *et al.*, 2003 ; Hellio *et al.*, 2007) et à différents stades de développement. Chez cette espèce, l'existence de deux types d'activité PO a été démontrée: une activité catécholase et une activité laccase (Luna-Acosta *et al.* 2012). Il a également été mis en évidence, *in vitro*, un effet bactéricide lié à l'activité des POs contre deux agents pathogènes de l'huître creuse, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Thomas-Guyon *et al.*, 2009 ; Luna-Acosta *et al.*, 2012).

Par ailleurs, des barrières physico-chimiques telles que la coquille, le mucus et le manteau représentent des premières lignes de défense contre les agresseurs chez les bivalves.

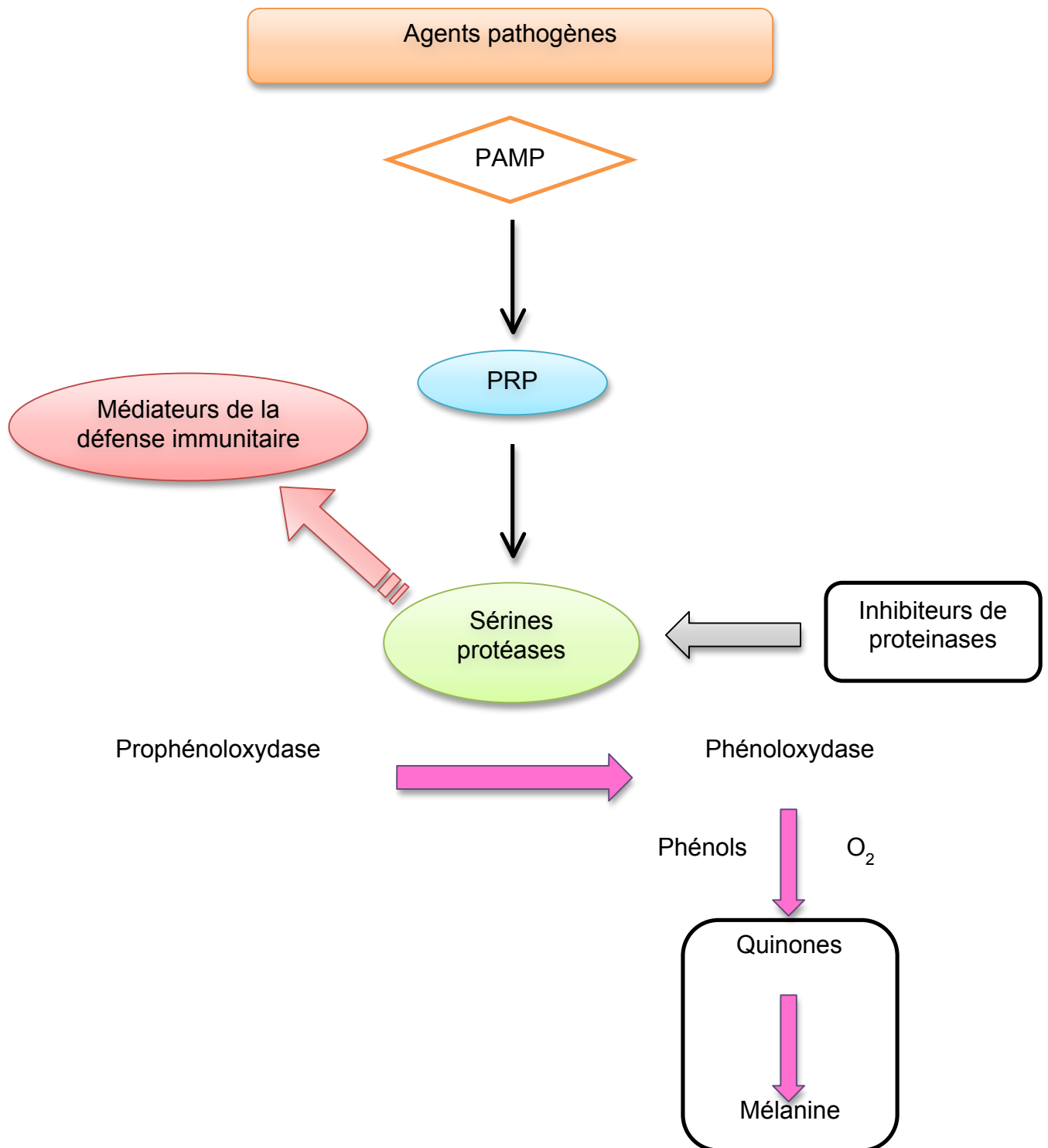


Figure 26. Activation du système phénoloxydase (ProPO) chez les invertébrés (d'après Söderhäll & Cerenius, 1998)

5. Immunité anti-virale

Des travaux rapportent une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans des extraits de moule (*M. edulis*), de clam (*M. mercenaria*) et d'huître creuse (*C. gigas*) (Limasset 1961). Il a également été mis en évidence des activités antivirales chez les bivalves marins (Li *et al.*, 1965 ; Li *et al.*, 1968 ; Li & Traxler 1972). En effet, une activité antivirale a été identifiée dans des extraits de glande digestive de *M. mercenaria*. Ces extraits ont démontré une inhibition de la formation de tumeurs par un adénovirus de type 12, chez le hamster (Li *et al.*, 1965 ; Li *et al.*, 1968). Cette activité serait portée par une protéine nommée Paolin. Une molécule de type Paolin a été également isolée dans des extraits d'huître (Prescott *et al.*, 1966). Le peptide Kahalalide E, présentant une activité anti-HSV-2, a été isolé à partir du mollusque, *Elysia rufescens* (Hamann *et al.*, 1996). En 1990, des travaux ont mis en évidence une substance issue d'hémolymphe de *C. gigas* adultes capable de neutraliser l'activité de coliphage T3 *in vitro*. Cette activité serait due à une serine protéase (Bachère *et al.*, 1990). Lee et Maruyama ont isolé, chez cette même espèce, un peptide issu d'un hydrolysat protéique intervenant en tant qu'inhibiteur de la protéase du virus de l'immuno-déficience humaine de type 1 (VIH-1) (Lee & Maruyama 1998). Enfin, Olicard *et coll.* (2005) ont démontré un effet antiviral de l'hémolymphe de *C. gigas* sur le virus HSV-1 et le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI).

Des études récentes ont montré une importante augmentation de l'expression des transcrits pour certains gènes (myeloid differentiation factor 88 : MyD88, macrophage expressed protein et multicopper oxydase) durant une infection par OsHV-1 (Renault *et al.*, 2011). Segarra *et coll.* (2014) ont également montré une augmentation de l'expression des transcrits de certains gènes (MyD88, Inhibiteur du facteur nucléaire kappaB kinase beta : Ikb2, Interferon induced protein 44 : IFI44 et un IAP) lors d'une infection virale à OsHV-1 chez *C. gigas*. Ces résultats suggèrent que les produits de ces gènes sont impliqués dans les interactions entre le virus OsHV-1 et son hôte.

6. Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation de matériel intracellulaire (cytoplasme et organelles principalement) présent chez les cellules eucaryotes. Ce processus est activé en réponse à différentes conditions de stress (Klionsky, 2007). Le rôle premier de l'autophagie est de maintenir l'homéostasie en dégradant et recyclant continuellement des composants cytoplasmiques. Initialement, l'autophagie a été considérée comme un simple processus de dégradation, mais des études récentes ont démontré un rôle de cette voie dans de nombreuses maladies chez l'homme. L'autophagie offre également à chaque cellule un moyen de défense contre des agents pathogènes présents dans le cytoplasme. En outre, il a également été suggéré que l'autophagie pouvait jouer un rôle dans les fonctions de développement et d'anti-vieillessement dans les cellules animales.

La première description de l'autophagie a été faite par de Duve et coll. (1955). Le terme « autophagie » a été utilisé pour illustrer des observations faites en microscopie électronique : des vésicules présentant une ou deux membranes dans lesquelles se trouvaient une portion de cytoplasme et/ou des organites intracellulaires en dégradation (Ashford & Porter, 1962 ; Clark, 1957). La période des années 1960 aux années 1980 a surtout contribué à l'analyse morphologique de l'autophagie. Les premiers travaux entrepris pour étudier les étapes initiales du processus ont permis d'identifier le phagophore, organelle primaire qui séquestre le matériel à éliminer, ainsi que l'amphisome qui caractérise la fusion entre les vésicules de la voie d'endocytose et les autophagosomes (Gordon & Seglen, 1988). L'analyse de l'autophagie chez la levure a ensuite permis une avancée dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la formation des autophagosomes. Il a en particulier été montré que la machinerie de l'autophagie est comparable entre la levure et les cellules de mammifères (Takeshige *et al.*, 1992).

La fonction la plus classique de l'autophagie est le recyclage cellulaire afin de maintenir le métabolisme en cas de rupture d'apports énergétiques et de prévenir l'accumulation de toxines lors d'un stress métabolique. Dans la plupart des situations, l'autophagie permet la survie de la cellule, mais il existe un certain nombre de preuves que l'autophagie peut être le point de départ de la mort cellulaire par apoptose, nécrose, voire par autophagie elle-même (White 2008). On sait par exemple que la molécule Bcl2, inhibiteur connu de l'apoptose permet à la cellule de rester au stade de l'autophagie et de ne pas progresser vers la mort cellulaire (Levine & Kroemer 2008).

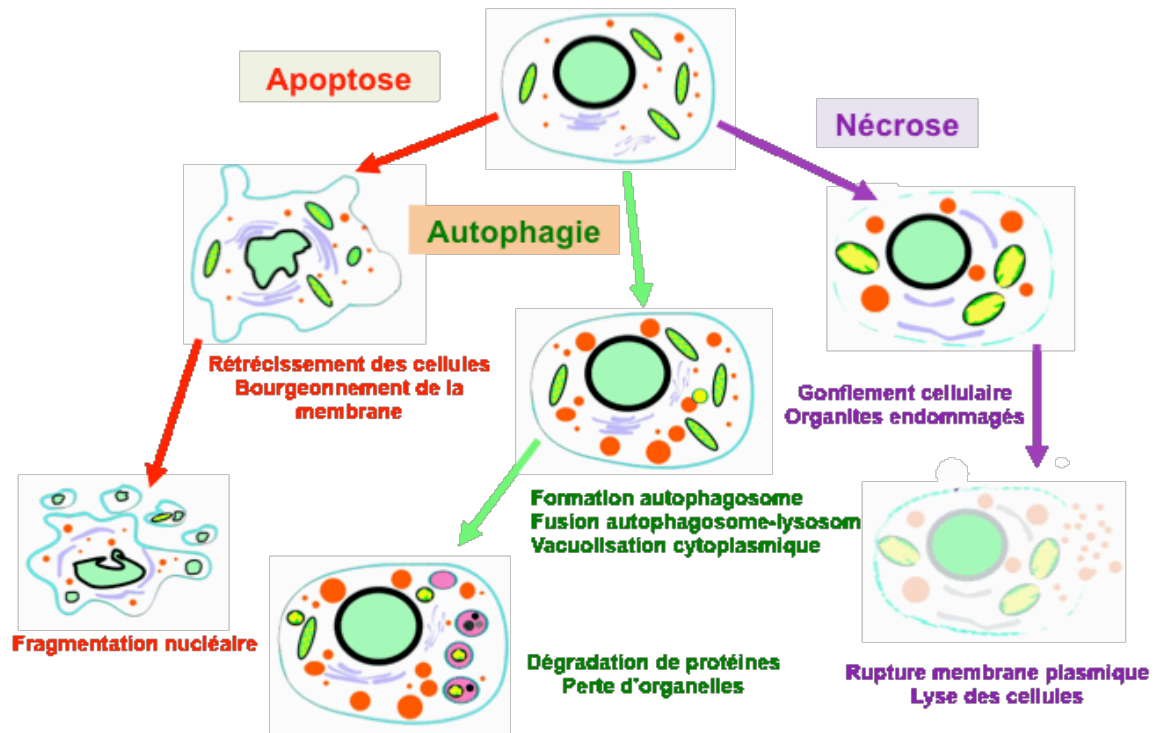


Figure 27. Description des voies de l'apoptose, de l'autophagie et de la nécrose (modifié d'après Tan et al., 2014)

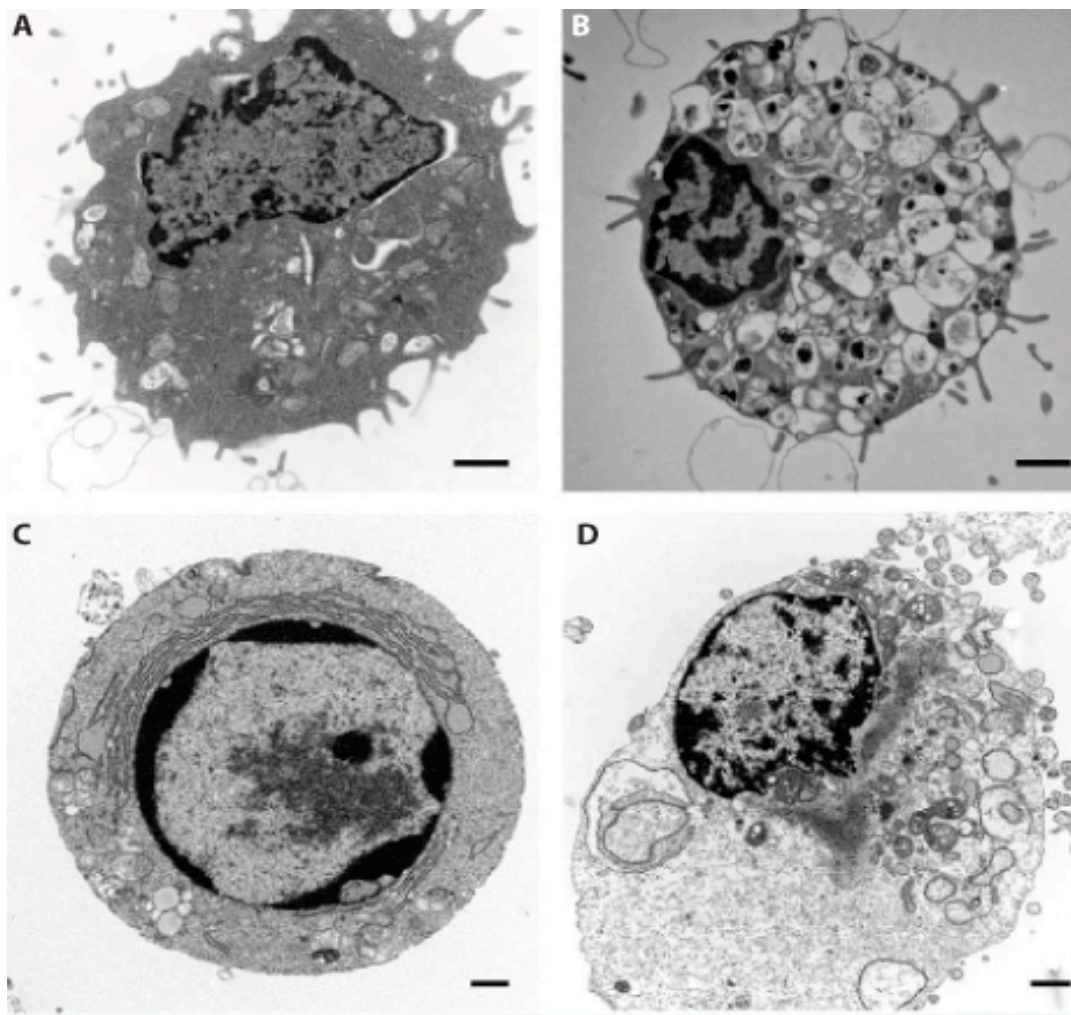


Figure 28. Illustration, en microscopie électronique, des différences morphologiques entre apoptose, nécrose et autophagie par comparaison à une cellule saine (A). L'apoptose (C), est caractérisée par une condensation nucléaire avec une fragmentation de L'ADN et un clivage de celui-ci. Au contraire, la nécrose cellulaire (D) est caractérisée par une vacuolisation cytoplasmique. Elle aboutit à une lyse de la cellule. L'autophagie (B) est différente avec la formation de vésicules à double membrane (les autophagosomes) qui encapsulent les différents organelles (D'après Bonniaud., 2008)

Chez la levure, la machinerie de l'autophagie est concentrée dans la zone périvacuolaire appelée structure pré-autophagosomale, servant de site d'assemblage pour le phagophore (PAS) (Kim *et al.*, 2002a ; Suzuki *et al.*, 2001). Le premier gène impliqué dans la formation des autophagosomes à être identifié a été le gène ATG1 (autophagy-related gene 1 ou Serine/threonine protein kinase 1) (Matsuura *et al.*, 1997). Les premiers gènes caractérisés chez les mammifères sont les gènes ATG5 et ATG12 (Mizushima *et al.*, 1998). Une autre étape majeure a été la découverte du gène ATG8 (LC3) et le développement d'une technique biochimique permettant de suivre l'activation de l'autophagie chez les cellules eucaryotes, par l'observation du clivage de cette protéine (Kabeya *et al.*, 2000). De nos jours, plus de 30 gènes de l'autophagie ont été identifiés (Kabeya *et al.*, 2007).

a. Mécanisme de formation des autophagosomes

Il existe trois voies distinctes d'autophagie

- (1) l'autophagie coordonnée par des protéines chaperonnes adresse des protéines cytosoliques directement dans le lysosome (Majeski & Dice, 2004);
- (2) la micro-autophagie dégrade des fragments du cytosol par invagination de la membrane du lysosome (Kunz *et al.*, 2004);
- (3) la macro-autophagie, plus communément appelée autophagie, séquestre des parties importantes du cytoplasme dans des vésicules appelées autophagosomes qui sont dégradées après fusion avec des lysosomes (Klionsky, 2005).

La macro-autophagie utilise des vésicules spécialisées qui fusionnent avec les lysosomes pour la séquestration et la dégradation de matériel intracellulaire (Figure 29). La micro-autophagie consiste en l'internalisation directe d'une partie de cytoplasme au niveau du lysosome par l'invagination de sa membrane (Figure 29). L'autophagie dépendante de chaperonnes moléculaires se déroule également au niveau du lysosome, mais se réalise par translocation de protéines non repliées, associées à des protéines chaperonnes, au travers de la membrane (Figure 29). Seule la macro-autophagie a été décrite dans les interactions entre l'hôte et les agents pathogènes, c'est pour cette raison que seuls les mécanismes moléculaires de la macro-autophagie (appelé autophagie par la suite) sont décrits dans ce manuscrit. Sur la trentaine de gènes impliqués dans l'autophagie, un groupe est particulièrement nécessaire pour la formation des autophagosomes, celui appartenant au « noyau » de la machinerie ou «

core machinery » (Xie & Klionsky 2007). Les gènes sont divisés en trois groupes fonctionnels distincts :

- Le groupe comprenant l'Atg9 et des gènes associés: le complexe kinase Atg1 comprenant les deux protéines Atg1 et Atg13, l'Atg2 et l'Atg18.
- Le complexe PI3K, comprenant les protéines Vps34, Vps15, l'Atg6 (Vps30) et l'Atg14.
- Deux systèmes de conjugaison similaires à l'ubiquitylation (Ubl), comprenant les protéines Atg8, Atg12, Atg7, Atg10, Atg3, Atg4, Atg5 et Atg16.

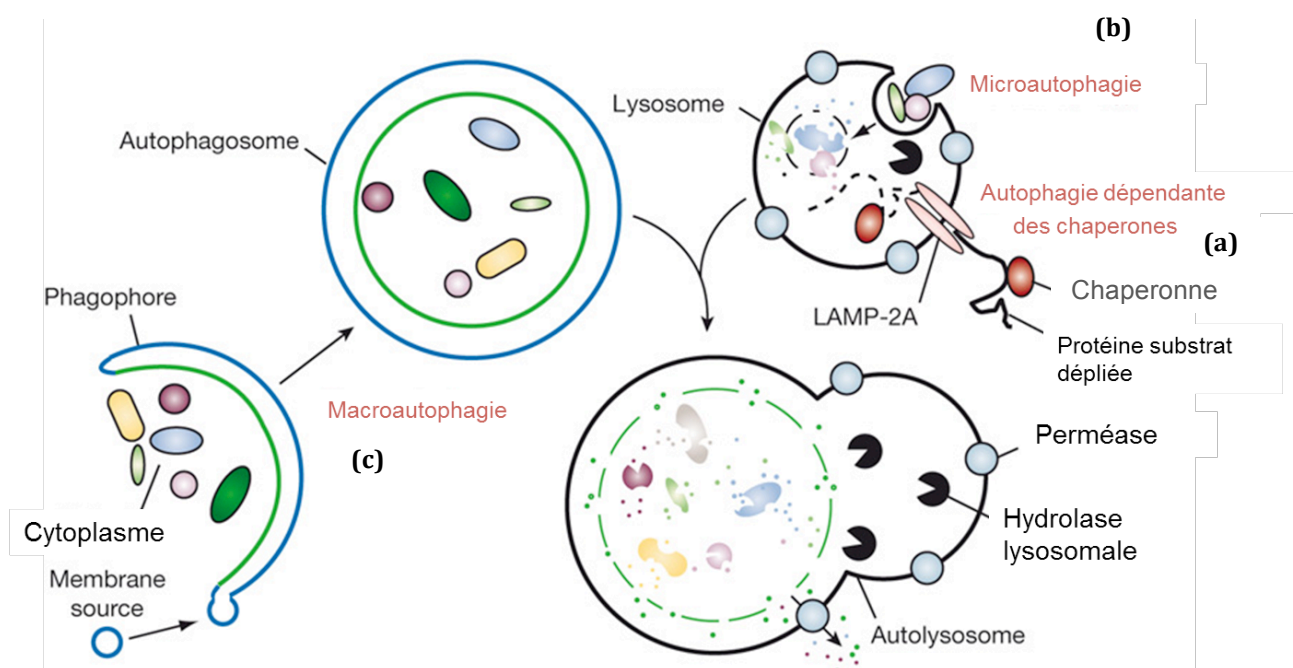


Figure 29. Représentation schématique des trois types d'autophagie. (a) L'autophagie dépendante de protéines chaperonnes. (b) La microautophagie (c) La macroautophagie (D'après Mizushima *et al.*, 2008).

L'initiation de la formation des autophagosomes se déroule au niveau du Site d'assemblage du phagophore (PAS) (Suzuki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Le PAS peut être défini comme une sorte d'hybride entre la vésicule en formation et la machinerie protéique du « core ». L'action des protéines du « core » au niveau du PAS permet son évolution vers un autophagosome proprement dit. Cette association entre le « core » et le PAS a été observée dans la levure ainsi que dans des cellules de mammifères (Kirisako *et al.*, 1999 ; Mizushima *et al.*, 2001 ; Mizushima *et al.*, 2003). L'Atg9 est une protéine transmembranaire, localisée sur le PAS, et permet le recrutement des protéines Ubl au niveau du PAS (Suzuki *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter qu'à l'inverse des autres protéines Atg qui sont localisées dans le cytosol sous une forme non activée, l'Atg9 est localisée dans le réseau trans-Golgi et les endosomes (Noda *et al.*, 2000). Le mouvement d'Atg9 de ces structures vers le PAS est nécessaire pour la formation des autophagosomes (Reggiori *et al.*, 2004). Ce transport pourrait contribuer à l'apport de membranes au niveau du PAS afin de permettre son expansion (Reggiori & Klionsky 2006 ; Yen *et al.*, 2007). Chez la levure, le transport de l'Atg9 vers le PAS requiert l'Atg23 et l'Atg27 (Tucker *et al.*, 2003 ; Legakis *et al.*, 2007). La dissociation de l'Atg9 du PAS dépend du complexe kinase Atg1, de l'Atg2 et de l'Atg18 (Reggiori *et al.*, 2004). L'absence de l'une de ces protéines induit l'accumulation de l'Atg9 sur le PAS (Reggiori *et al.*, 2004). L'Atg1 est une protéine kinase à sérine-thréonine et son activité est nécessaire pour l'autophagie (Kamada *et al.*, 2000). L'Atg2 et l'Atg18 sont deux protéines qui interagissent avec l'Atg9 au niveau de la membrane du PAS (Guan *et al.*, 2001). Un modèle a été proposé pour expliquer la libération de l'Atg9 de la membrane du PAS. Dans une première étape, l'Atg9 et le complexe Atg1 (ULK1) sont recrutés au niveau du PAS. Ensuite, l'Atg18 et l'Atg2 sont recrutés à leur tour au niveau du PAS, où ils interagissent avec l'Atg9, entraînant la dissociation de l'Atg9 du PAS (Xie & Klionsky 2007).

Le complexe PI3K est présent au niveau du PAS lorsque l'autophagie est activée et permettrait le recrutement de l'Atg18, qui participe à la dissociation de l'Atg9 de la membrane du PAS (Reggiori *et al.*, 2004). Ce complexe comprend la protéine kinase Vps34, traditionnellement impliquée dans le trafic membranaire entre les endosomes et les lysosomes (Lindmo & Stenmark 2006), la protéine Vps15 nécessaire à l'activation de Vps34 (Stack *et al.*, 1993 ; Panaretou *et al.*, 1997), l'Atg6 (Bécline 1 chez les mammifères) (Liang *et al.*, 1999) et l'Atg14.

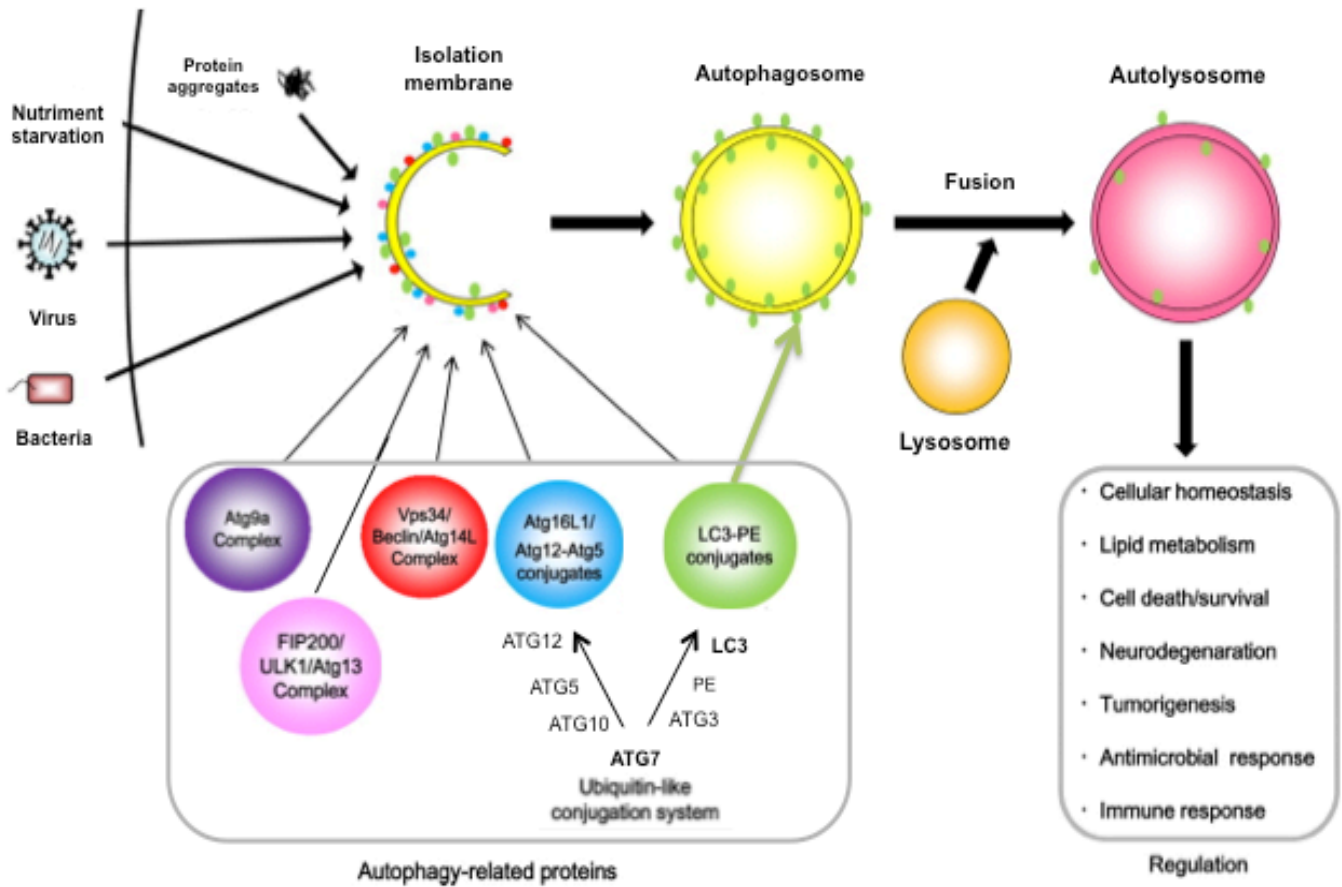


Figure 30. ATG : éléments essentiels pour la formation des autophagosomes (d'après Saitoh & Akira, 2014).

Pour permettre l'expansion de la vésicule en formation, deux systèmes de conjugaison protéiques sont nécessaires, le système Atg12-Atg5 et le système Atg8 (Figure 30) (Ohsumi, 2001).

Dans le système Atg12-Atg5, une liaison se forme entre le résidu glycine du côté C-terminal de l'Atg12 et le résidu leucine de l'Atg5 (Mizushima *et al.*, 1998). Deux autres protéines sont nécessaires pour la formation du conjugué, il s'agit de l'Atg7, un homologue de l'enzyme Uba1 (Kim *et al.*, 1999), et l'Atg10 qui fonctionne comme une enzyme E2 au cours du processus d'ubiquitylation (Shintani *et al.*, 1999). L'Atg7 se lie au résidu glycine C-terminal de l'Atg12 par son site cystéine afin de former une liaison thioester. L'hydrolyse de l'ATP active ensuite l'Atg12 qui est transférée sur l'Atg10. Pour finir, l'Atg12 est liée d'une manière covalente à la lysine interne de l'Atg5 pour former le conjugué final. Ce conjugué lie ensuite l'Atg16 qui peut former des oligomères ce qui crée une structure multimérique comprenant l'Atg12, l'Atg5 et l'Atg16 (Figure 30) (Kuma *et al.*, 2002). Cette structure est importante pour la formation des autophagosomes et permettrait également la stabilité du second système de conjugaison au niveau du PAS (Yorimitsu & Klionsky 2005).

L'autre système de conjugaison conduit à la modification de l'Atg8 et à son association sur la membrane du PAS (Kirisako *et al.*, 2000; Ichimura *et al.*, 2000). L'Atg8 a été caractérisée comme une protéine associée aux microtubules nécessaires pour l'autophagie (Lang *et al.*, 1998), bien que son association fonctionnelle avec les microtubules n'ait pas été démontrée. La première étape de la conjugaison de l'Atg8 est la protéolyse du résidu arginine du côté C-terminal de la protéine par la protéase Atg4, exposant un résidu glycine accessible à l'Atg7 (la même enzyme utilisée dans le système Atg12-Atg5). L'Atg7 active l'Atg8, induisant son transfert sur l'Atg3 et sa conjugaison avec la phosphatidyléthanolamine (PE) par une liaison amide. L'Atg8 conjuguée au PE se comporte comme une protéine membranaire et va se lier à la membrane du PAS. La conjugaison de l'Atg8 au PE est réversible puisque l'Atg4 peut de nouveau cliver l'Atg8 après le résidu glycine et ainsi enlever le PE (Kirisako *et al.*, 2000). Il existe au moins trois homologues de l'Atg8 dans les cellules de mammifères, il s'agit de GATE-16, GABARAP et MAP1LC3 (Kabeya *et al.*, 2000). Ces trois protéines sont modifiées de la même manière que l'Atg8 et sont retrouvées au niveau des autophagosomes. La protéine LC3 a été bien caractérisée et est utilisée depuis quelques années comme l'un des marqueurs spécifiques des autophagosomes.

b. Régulation de l'autophagie

Dans les années 1960, il a été montré que le glucagon induisait l'autophagie (Deter & De Duve, 1967). Dix ans plus tard, l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'autophagie a été démontré (Pfeifer, 1977). Ces études sur les hormones impliquées dans le métabolisme renseignent sur le rôle catabolique de l'autophagie. Plusieurs études ont montré le rôle inhibiteur d'acides aminés sur l'autophagie (Mortimore & Schworer, 1977) ainsi qu'un certain nombre de composés pharmacologiques, comme la 3-méthyladénine (3-MA) (Seglen & Gordon, 1982).

À la suite de ces études, la culture de cellules dans un milieu dépourvu en nutriment est devenue l'une des techniques majeures pour stimuler l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2008). Le gène TOR, qui code la protéine ciblée par la rapamycine, a été identifié chez la levure (Kunz *et al.*, 1993) et chez les mammifères. Le rôle de la rapamycine, un inhibiteur de Tor, a été montré sur l'induction de l'autophagie (Blommaart *et al.*, 1995). Certains acides aminés stimulent Tor, établissant une connexion entre la régulation de l'autophagie par les acides aminés et Tor. Une régulation de l'autophagie par des inhibiteurs de protéines kinase PI3K, comme la wortmannine (Wm) et la 3-méthyladénine (3-MA) a également été montrée (Blommaart *et al.*, 1997). Récemment, la protéine kinase PDK1 (dépendante du phosphoinositide 3) a été identifiée, apportant le lien entre le signal de l'insuline, les phosphoinositides, la protéine kinase B (PKB) et Tor.

c. Agents pathogènes et autophagie

Plusieurs récepteurs cellulaires (PRR) stimulent l'autophagie au contact de leurs ligands microbiens (PAMP). La sérine/thréonine kinase PKR est le premier PRR décrit pour exercer ce rôle. PKR reconnaît des ARN viraux double brin et active l'autophagie en phosphorylant l'eukaryotic initiation factor 2- α (eIF2 α). Les mécanismes d'activation de PKR et de phosphorylation d'eIF2 α dans l'induction de l'autophagie lors d'infections virales restent cependant inconnus (Deretic & Levine, 2009). Plus récemment, il a été décrit que la liaison de ligands exprimés par des agents pathogènes à des récepteurs de la famille des Toll-like receptors (TLR) exprimés sur les membranes endosomales (TLR3/7) ou cytoplasmiques (TLR1/2/4) conduit à l'induction de l'autophagie (Xu *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2008). Selon leur nature, ces récepteurs utilisent des voies de signalisation distinctes: TLR7 engage la protéine adaptatrice MyD88, alors que TLR4 implique la protéine Toll/interleukin-1 receptor [TIR]-domain containing adaptor inducing interferon beta (TRIF). Shi *et coll.* (2008)

ont montré que MyD88 et TRIF peuvent lier la protéine autophagique Beclin-1, ce qui pourrait soutenir l'induction d'autophagie par les TLR (Shi & Kehrl, 2008). L'interféron gamma (IFN-) induit l'autophagie dans les macrophages par une voie de signalisation impliquant l'immunity-related GTPase (GTPase IRG) (Deretic & Levine, 2009). De même, des signaux alertant sur des dommages cellulaires liés à une infection activent la machinerie autophagique : c'est le cas de la réponse à un repliement défectueux des protéines (unfolded protein response : UPR) consécutif à une production excessive de protéines lors d'infections virales, de modifications de gradients ioniques intracellulaires ou encore de la production de dérivés de l'oxygène (Sumpter & Levine, 2010). L'identification des senseurs d'agents pathogènes capables d'induire l'autophagie et celle des intermédiaires moléculaires qui en sont responsables sont encore préliminaires et représentent un défi d'envergure pour la compréhension des relations entre autophagie et agents pathogènes.

Présente à l'état basal, l'autophagie peut augmenter en réponse à la détection par la cellule d'agents pathogènes pour dégrader ces derniers par xénophagie, et/ou servir d'intermédiaire à la mise en place d'autres réponses antimicrobiennes. L'autophagie a été décrite comme un mécanisme de dégradation non spécifique. Ainsi, l'augmentation de ce processus en réponse à la détection d'agents pathogènes présents dans le cytoplasme pourrait suffire à la capture et à l'élimination de ces derniers. Cependant, de récents travaux décrivent un adressage sélectif d'agents pathogènes ou de certains de leurs composants vers les autophagosomes. *Salmonella typhimurium* est une bactérie intracellulaire Gram négatif pour laquelle une partie des bactéries est dégradée par autophagie dans les cellules infectées. Deux processus permettent l'adressage de *S. typhimurium* vers cette voie : (i) certaines bactéries sont rapidement recouvertes d'ubiquitine dans le cytosol, puis dirigées vers la voie autophagique grâce au pontage de la protéine cellulaire p62 qui possède un domaine de liaison pour l'ubiquitine et un autre pour la protéine autophagique LC3 (Zheng *et al.*, 2009) ; (ii) d'autres bactéries sont adressées vers l'autophagie via des signaux impliquant la formation de diacylglycérol (DAG) qui se lie aux membranes endommagées des vésicules d'internalisation des bactéries (Shahnazari *et al.*, 2010).

Ainsi, plusieurs mécanismes semblent coexister et contribuent à diriger les agents pathogènes intracellulaires ou certains de leurs composants, vers la machinerie autophagique. Quel que soit le mécanisme d'induction et/ou de ciblage autophagique, ce processus intervient dans le contrôle du nombre d'agents infectieux (Deretic & Levine, 2009). La dégradation autophagique de *Streptococcus pyogenes* est la première à avoir été démontrée (Nakagawa *et*

al., 2004). Cette bactérie extracellulaire à Gram positif peut pénétrer dans les cellules épithéliales. Les bactéries s'échappent alors des endosomes et, dans le cytosol, sont prises en charge par l'autophagie. Rapidement après infection, près de 80 % d'entre elles se retrouvent dans des autophagosomes. De plus, alors qu'elles sont très efficacement éliminées dans des cellules saines, elles ne le sont plus dans des cellules dont la machinerie autophagique est déficiente, et peuvent même y proliférer.

La place de la dégradation autophagique dans les infections virales reste en revanche plus floue (Le Roux & Niedergang, 2010). La réplication de plusieurs virus est exacerbée dans des cellules dont l'autophagie est bloquée, ce qui indique un rôle protecteur contre les virus. Le seul exemple décrit à ce jour d'une dégradation de protéines virales par autophagie montre que ce processus protège d'un effet délétère dû à l'accumulation de protéines virales dans les cellules infectées, mais n'a pas de conséquences sur la réplication virale elle-même (Orvedahl *et al.*, 2010). Il est néanmoins probable que l'autophagie puisse dégrader des particules virales ou des composants viraux. Cela a été montré pour une souche recombinante du virus herpes simplex 1 (HSV-1) qui n'exprime pas le facteur de virulence ICP34.5 : elle est détectée dans des autophagosomes avant d'être dégradée (Figure 32) (Orvedahl *et al.*, 2007).

Les agents pathogènes intracellulaires sont au contact permanent des composants de la machinerie d'autophagie cellulaire. Il paraît donc très probable que nombre d'entre eux, capables d'éviter l'autophagie, de l'inhiber ou de l'utiliser à leur profit, aient été sélectionnés au cours de l'évolution.

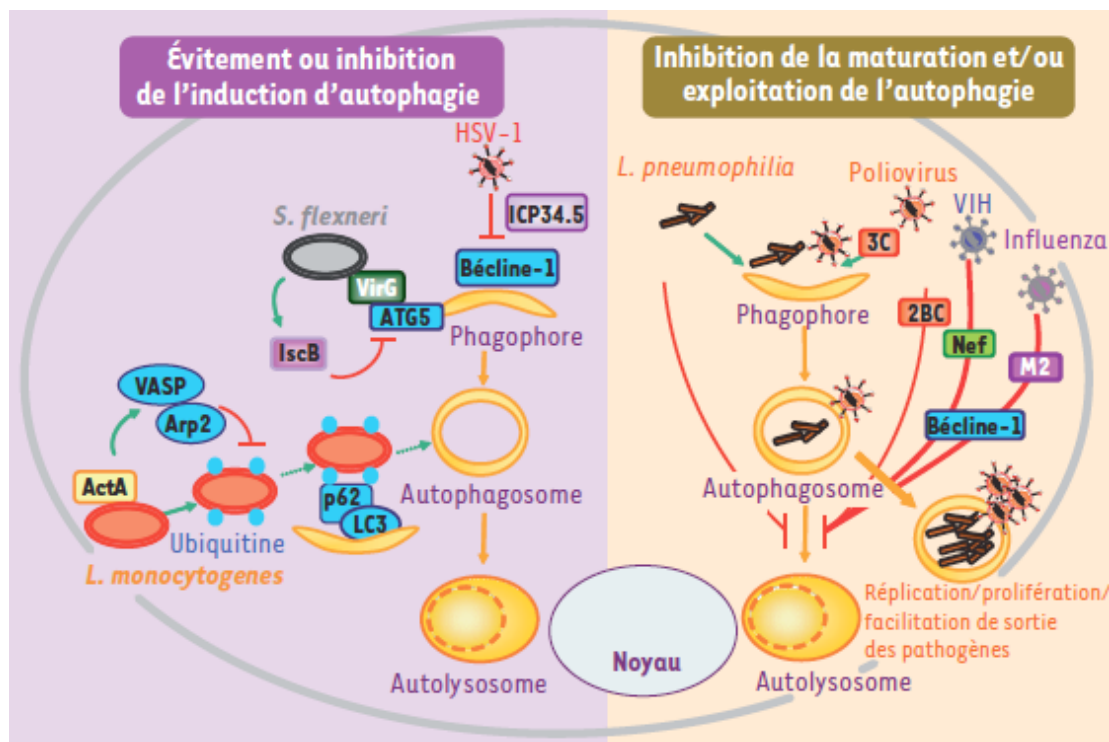


Figure 31. Mécanismes d'échappement et de détournement de l'autophagie par des agents pathogènes. (D'après Joubert *et al.*, 2011).

Certains agents pathogènes ont développé des stratégies qui leur permettent de s'exclure activement du processus autophagique sans toutefois l'inhiber (Deretic & Levine, 2009). L'infection par *Shigella flexneri* mène rapidement à l'adressage des vestiges membranaires d'internalisation vers l'autophagie par une voie dépendante de p62 (Dupont *et al.*, 2009). Egalement, la protéine de surface VirG de *S. flexneri*, impliquée dans la mobilité bactérienne par polymérisation de l'actine, lie ATG5, ce qui adresse la bactérie vers la voie autophagique. Pour échapper à ce ciblage, la bactérie sécrète le facteur IcsB pour masquer le site de liaison de ATG5 sur VirG et détourner ainsi la bactérie de cette voie (Figure 31) (Ogawa *et al.*, 2005). Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, la protéine ActA va prévenir l'ubiquitinylation de l'agent infectieux dans le cytoplasme en recrutant des protéines cellulaires à la surface bactérienne (Yoshikawa *et al.*, 2009). Des bactéries dépourvues de cette activité d'ActA

seront ubiquitinyllées, reconnues par p62 et adressées vers la voie de dégradation autophagique (Figure 31).

Seuls des virus ont été à ce jour clairement impliqués dans l'inhibition de la phase initiale du processus d'autophagie. L'exemple le plus démonstratif est celui de HSV-1. Le facteur de virulence de ce virus, ICP34.5, interagit physiquement avec Beclin-1 et cette interaction prévient l'autophagie et l'annihile. ICP34.5 agit également à ce stade initial en prévenant l'activité de la PKR (Deretic & Levine, 2009).

L'inhibition de la fusion des lysosomes avec les autophagosomes est la stratégie la plus fréquemment utilisée par les micro-organismes pour contrecarrer l'autophagie. Bactéries, virus et parasites utilisent cette stratégie via des mécanismes moléculaires encore mal connus. Par exemple, au cours de l'infection par *Legionella pneumophila*, l'autophagie est induite via le système de sécrétion bactérien de type IV. Cependant, cette bactérie retarde la maturation des autophagosomes, par des mécanismes toujours inconnus permettant son adaptation à des compartiments intracellulaires acides (Amer & Swanson, 2005). De même des *L. monocytogenes* mutantes exprimant de faibles quantités de listériolysine O (une enzyme responsable de la perforation des vésicules d'internalisation qui permet l'échappement des bactéries dans le cytoplasme) restent contenues au sein de structures appelées SLAP (spacious listeria-containing phagosomes) aux caractéristiques autophagiques. Ces compartiments ne s'acidifient pas, ce qui empêche la dégradation des bactéries et permet même leur réplication, à un niveau cependant plus faible que celui qui est observé lors de leur réplication dans le cytosol (Birmingham *et al.*, 2008).

L'autophagie produit de nombreux métabolites primaires, ce qui en fait une cible intéressante pour tout agent pathogène s'il peut en détourner l'activité pour son propre compte. Certains agents pathogènes bactériens peuvent utiliser l'auto-séquestration et bénéficier d'éléments nutritifs exploitables pour leur prolifération (Deretic & Levine, 2009). Ce détournement de l'autophagie pour leur propre bénéfice est bien documenté dans la littérature dans le cas des virus. L'inhibition de l'autophagie se traduit par une production plus faible de particules infectieuses dans le cas des virus de la poliomyélite, de l'immunodéficience humaine (VIH) et de l'hépatite C. Le poliovirus, via les protéines 2BC et 3C, induit un processus d'autophagie dans les cellules qu'il infecte et tire avantage de ce mécanisme pour augmenter sa virulence. Le virus pourrait induire la formation d'autophagosomes qui portent sa machinerie de réplication et/ou il utiliserait les vésicules autophagiques pour faciliter sa sortie

des cellules (Deretic & Levine, 2009). La protéine NEF (facteur négatif) du VIH semble également être un facteur de virulence qui, en s'associant à Beclin-1, inhibe la maturation autophagique et augmente la production de particules infectieuses dans les macrophages infectés (Kyei *et al.*, 2009). Le virus de l'hépatite C exploite également cette voie à son bénéfice, cependant les mécanismes moléculaires impliqués sont encore inconnus (Dreux *et al.*, 2009). Récemment, un autre mode d'exploitation a été décrit pour le virus de la grippe. Par l'action de sa protéine M2 qui lie Beclin-1, ce virus va inhiber la maturation autophagique, avec pour conséquence de compromettre la survie des cellules infectées sans pour autant modifier la production de virus infectieux (Gannagé *et al.*, 2009).

La modulation de l'autophagie est une stratégie utilisée par différents herpèsvirus (Figure 32) (Liang, 2011). L'autophagie peut assurer la dégradation des virions ou des composants viraux par dégradation lysosomale. Elle peut aussi faciliter la présentation de peptides viraux par les antigènes CMH I / II. L'herpèsvirus HSV-1 par ses protéines ICP34.5, US11 et gB apparaît comme capable de bloquer l'activation de l'autophagie par PKR et eIF2 α ou de cibler directement Beclin 1 pour anihiler l'autophagie (ICP34.5). L'herpesvirus HCMV, semble capable de réduire l'autophagie par les voies mTOR dépendante ou indépendante. Le virus code les protéines VBCL-2 et vFLIP qui inhibent la formation des autophagosomes par médiation de Beclin 1 et l'allongement de l'autophagosome par médiation d'Atg3, alors que la protéine LMP1 de l'EBV et la protéine ATR de KSHV, ont été identifiés comme déclenchant l'autophagie soit pour la survie optimale des cellules infectées ou pour une réplication aiguë et une propagation du virus.

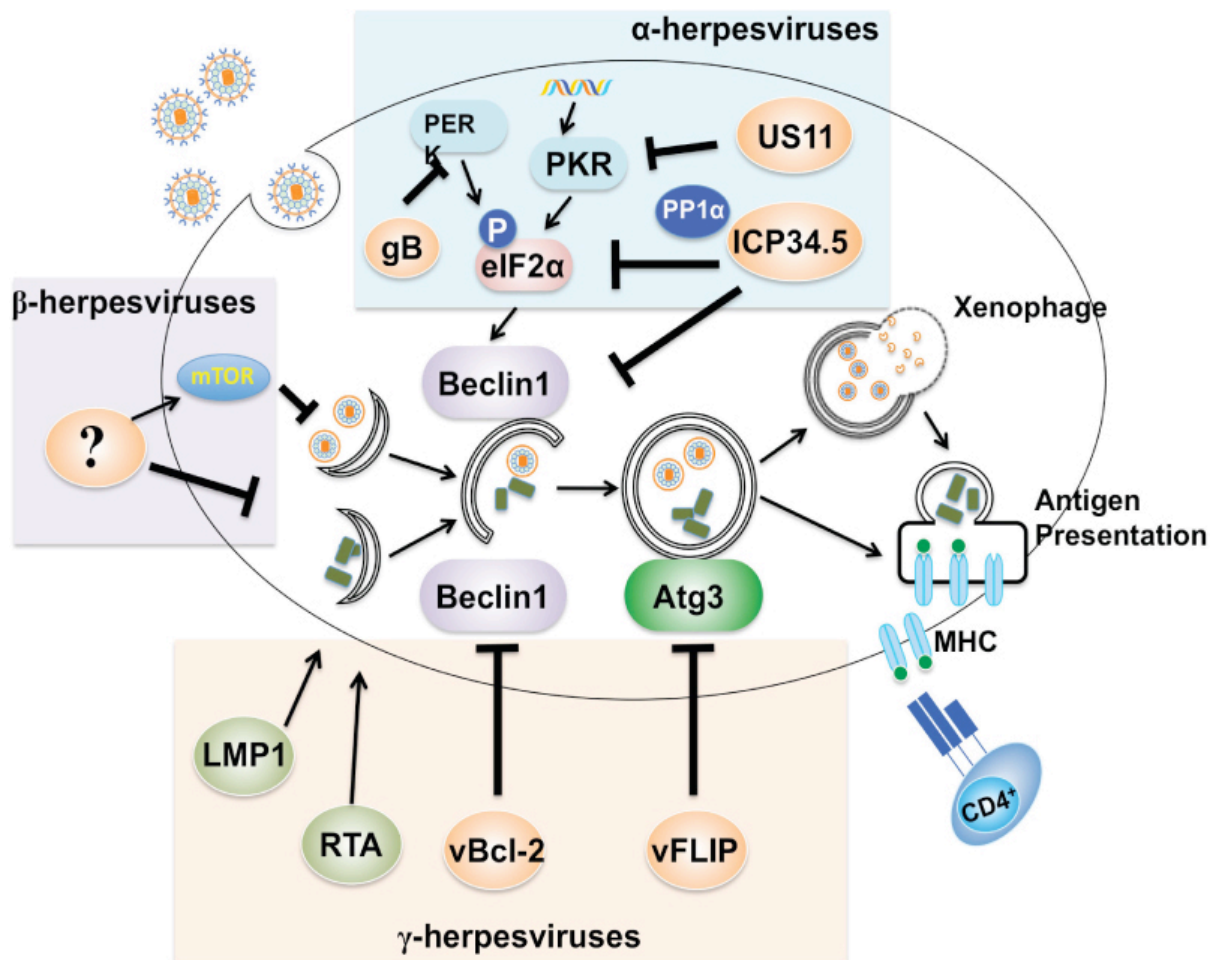


Figure 32. Interactions de différents herpèsvirus avec la machinerie de l'autophagie (d'après Liang, 2011).

VI. Facteurs environnementaux et pesticides

1. Facteurs environnementaux

Chez les mollusques bivalves, les mécanismes de défense sont modulés selon les conditions environnementales, les animaux étant directement exposés aux fluctuations de l'environnement (température, salinité, polluants, ...). Différents facteurs de stress intrinsèques ou extrinsèques peuvent menacer ou perturber l'équilibre homéostatique des organismes habitant les milieux côtiers (Moore *et al.*, 2004).

Tableau 2. Types de facteurs environnementaux

Facteurs biologiques	Facteurs physico-chimiques	Facteurs anthropiques
Interactions entre animaux (prédation, parasitisme, compétition pour l'espace, nourriture ou partenaires sexuels), maladies induites par les agents pathogènes	Radiations UV, augmentation du niveau de la mer, changements climatiques, érosion du sol, variations (température, salinité, O ₂ dissous, turbidité)	Industrialisation, rejets urbains et émissions domestiques, déforestation, surpêche (diminution des ressources), pratiques d'aquaculture (transport ou manutention), perturbations de l'habitat

Parmi ces facteurs de stress, les contaminations d'origine anthropique, telles que les pesticides, les métaux lourds et les hydrocarbures issus des rejets régulés et non régulés des activités industrielle ou des rejets urbains, constituent une source de pression importante. De plus, les pollutions agricoles peuvent poser des problèmes majeurs en affectant l'écologie des rivières et des estuaires, en réduisant la qualité des eaux de boisson et la santé des écosystèmes côtiers. L'impact des polluants et notamment des pesticides sur l'écosystème et la santé humaine est un problème international qui devient de plus en plus préoccupant avec l'augmentation constante du nombre de molécules rejetées dans l'environnement (Moore, 2002). Les perturbations environnementales comprennent des combinaisons variées de tous ces facteurs de stress (Moore *et al.*, 2004). L'évaluation des impacts du risque environnemental sur les animaux et les plantes est donc un défi majeur étant donnée la complexité des facteurs potentiellement impliqués, mais requiert la détermination effective des effets néfastes sur la santé des individus, tout comme l'identification de la cause (Moore, 2002). Il est de plus en plus reconnu que l'évaluation des impacts des polluants sur les

organismes requiert la compréhension des effets au travers des différents niveaux d'organisation biologique, depuis les niveaux moléculaire et cellulaire jusqu'à ceux de l'organisme et de la population, de la communauté et de l'écosystème (Moore *et al.*, 2004). Cependant, bien que les changements induits par les polluants aux niveaux des populations/communautés/écosystèmes/santé humaine soient les plus importants à étudier, ces niveaux sont généralement trop complexes pour servir au développement d'outils pour la détection précoce et la prédiction des conséquences du risque environnemental (Moore *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire de tenter de détecter des signaux de détresse aux niveaux moléculaire et cellulaire et de les lier aux conséquences possibles à des niveaux d'organisation plus élevés comme les grandes fonctions physiologiques de croissance et reproduction (Moore, 2002).

L'ensemble de ces réponses constitue la réponse intégrée aux facteurs de stress (Wendelaar-Bonga, 1997). Ainsi, l'animal peut surmonter la menace et maintenir son intégrité via des réponses génétiques, métaboliques, physiologiques et/ou comportementales de type compensatoires et/ou adaptatives. Cependant, lorsque l'animal subit un facteur de stress intense, ces réponses peuvent perdre leur valeur adaptative et devenir dysfonctionnelles. Ceci peut provoquer une inhibition de la croissance, un échec de la reproduction ou bien une résistance réduite aux agents pathogènes (Wendelaar-Bonga, 1997). Si un contaminant est nocif pour l'organisme, des interactions moléculaires peuvent se traduire, par exemple, par des variations de paramètres biochimiques. Au-delà d'un certain seuil de contaminants ou de la durée d'exposition, ces changements biochimiques peuvent avoir des effets physiologiques (Figure 33). Si un grand nombre d'individus sont affectés par ces modifications physiologiques, les effets des toxiques peuvent être décelables au sein des populations et perturber les performances écologiques telles que le taux de croissance, l'expansion, l'efficacité d'utilisation des ressources ou l'adaptabilité (Figure 34). À terme, la disparition ou bien l'expansion excessive de populations de certaines espèces peut avoir lieu. Lorsque ces phénomènes touchent des espèces clés de l'écosystème, ces effets peuvent se répercuter au niveau des communautés. Ainsi, la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble peuvent être modifiés (Moore *et al.*, 2004).

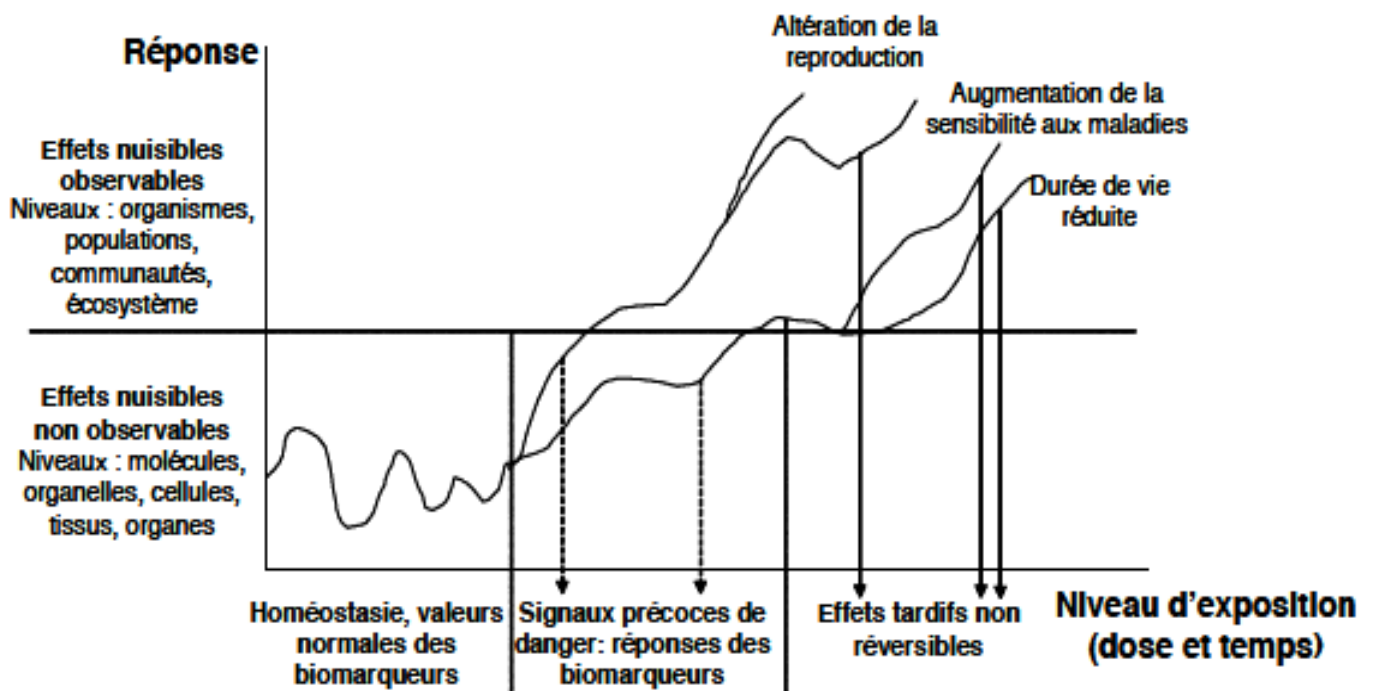


Figure 33. Schéma des réponses des organismes aux effets délétères dus à l'exposition à des polluants (modifié d'après Van der Oost *et al.*, 2003).

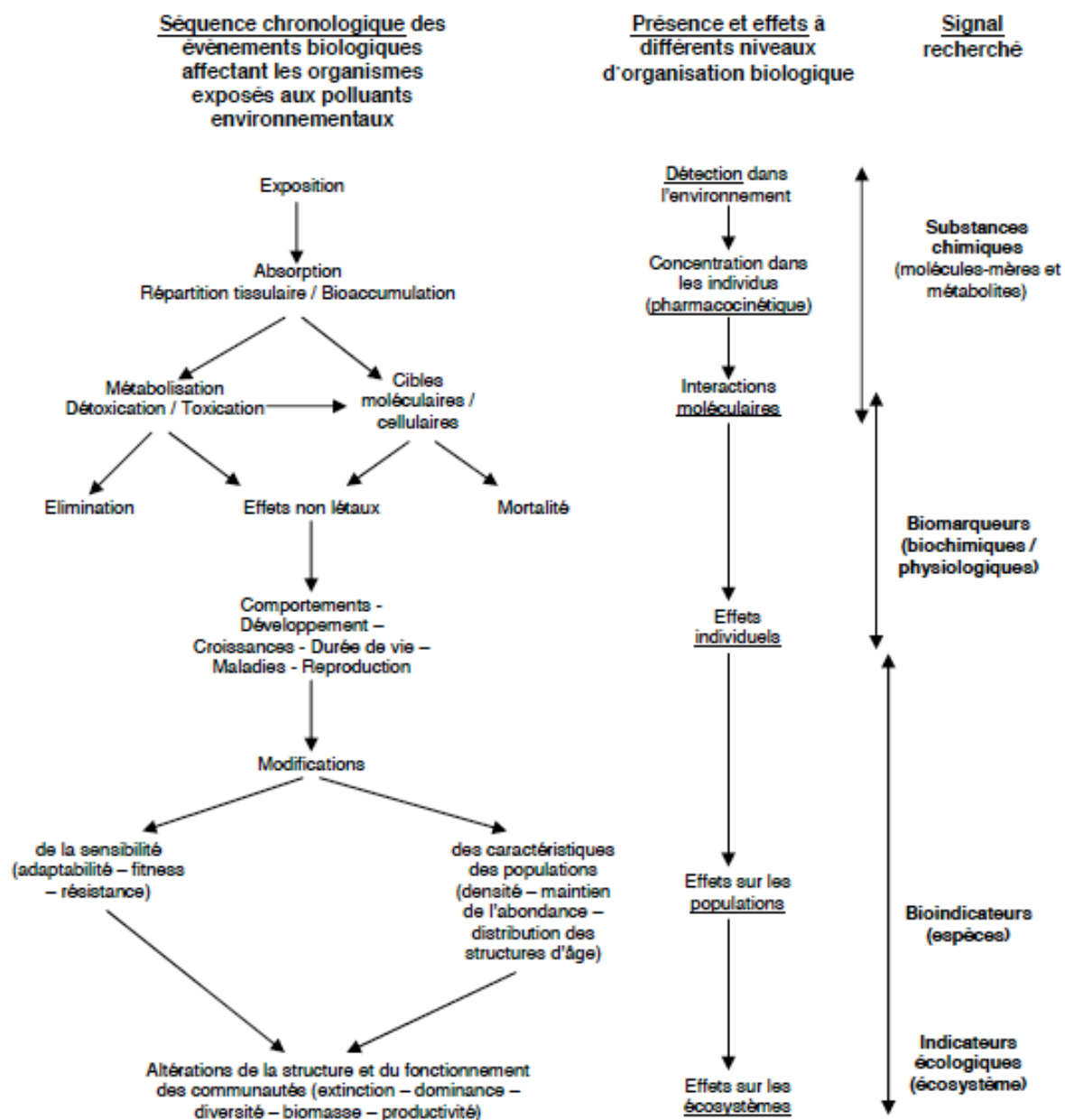


Figure 34. Enchaînement des effets toxiques sur les différents niveaux d'organisation biologique (modifié d'après Lagadic *et al.*, 1997).

2. Pesticides

Les pesticides sont classés en familles, selon leur cible, ou leur structure chimique. Il existe ainsi trois familles principales de pesticides en fonction d'un classement par cibles :

- (i) **Les fongicides** destinés à éliminer les moisissures et parasites fongiques des plantes.
- (ii) **Les insecticides** destinés à la lutte contre les insectes. Ils interviennent en les tuant ou en empêchant leur reproduction. Ce sont souvent les pesticides les plus toxiques et c'est dans cette famille que l'on trouve la plupart des polluants organiques persistants, dont le DDT et le lindane.
- (iii) **Les herbicides** destinés à lutter contre certains végétaux entrant en concurrence avec les espèces cultivées. Leur mode d'épandage est différent puisqu'ils sont déposés directement sur le sol, tandis que les autres produits sont plutôt pulvérisés sur la plante en croissance. Les herbicides constituent aujourd'hui la famille la plus importante en nombre de molécules et la plus utilisée.

Il existe d'autres cibles des pesticides comme les mollusques (limaces, escargots, ...). Le plus utilisé des molluscicides est le métaldéhyde. C'est un déshydrant qui provoque chez les mollusques l'émission d'un mucus très abondant. L'animal épuise ses réserves hydriques et meurt déshydraté.

Le classement par structure chimique (pesticides organiques) comprend :

- **Les urées substituées** : herbicides et fongicides, (nom avec le suffixe "uron").
- **Les pesticides carbamates** : fongicides et insecticides.
- **Les pesticides organochlorés** : parmi les plus anciens et les plus persistants, surtout utilisés comme insecticides en agriculture et dans les métiers du bois.
- **Les pesticides organophosphorés** : insecticides moins persistants que les précédents.
- **Les pesticides organoazotés** : herbicides principalement, repérables par le suffixe "zine".
- **Les pesticides sulfonilurées** : herbicides utilisés à des doses de quelques grammes par hectare seulement, contre quelques kilos pour les organoazotés par exemple.

Les pesticides sont des produits toxiques et peu persistants pour la majorité. En se dispersant dans l'environnement, ils sont susceptibles de contaminer les milieux et les chaînes alimentaires. Selon l'OMS, les facteurs influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme sont : la dose, les modalités de l'exposition, le degré d'absorption, la nature des effets de la matière active et de ses métabolites, l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme. Les effets toxiques du produit chez l'homme sont eux-mêmes liés à l'état de santé de l'individu exposé. Les mécanismes de la toxicité des pesticides ne sont véritablement connus que pour quelques molécules comme (i) l'induction enzymatique par les organochlorés et (ii) l'inhibition enzymatique par les dithiocarbamates et les organophosphorés.

Les recherches en cours envisagent d'autres modalités d'action de type immunitaire et hormonal. Des molécules interdites depuis plus de 30 ans (par exemple le DDE, métabolite du DDT) sont toujours retrouvées dans les écosystèmes aquatiques et portées sur les listes de substances prioritaires. Neuf cents substances actives se côtoient sur le marché mondial des pesticides. En France, on en compte environ 300 pour 6 000 préparations phytosanitaires. La Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ne surveille que 266 d'entre elles. Les analyses d'une enquête menée en 2010 (Environnement et Cancer) montrent qu'en 24h, un enfant est susceptible d'être exposé, uniquement par son alimentation, à des dizaines de molécules chimiques soupçonnées d'être cancérigènes ou bien encore des perturbateurs endocriniens par les instances sanitaires européennes ou américaines.

Les pesticides sont significativement très présents dans notre environnement quotidien (jardinage, traitement du bois, produits anti-moustiques et vétérinaires). Ils peuvent être absorbés par voie respiratoire et alimentaire ou par contact avec la peau. Chaque année, ce sont presque 5 000 tonnes de pesticides qui sont répandus dans les jardins ou les potagers en France. La France est le premier consommateur européen de pesticides et le quatrième au niveau mondial. Trente à cinquante pourcent d'un produit pesticide sont diffusés dans l'atmosphère lors de sa pulvérisation (Ministère de l'écologie, du développement durable - developpement-durable.gouv.fr).

Les pesticides et en particulier les herbicides sont majoritairement utilisés en agriculture, on parle alors de produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques. Ils font également l'objet d'un usage non agricole par les gestionnaires d'équipements ou de réseaux de transport, les

collectivités locales ou les particuliers, on parle alors de biocides. La plupart des pesticides sont des molécules organiques de synthèse. L'agriculture française en utilise environ quatre cents. Elles entrent dans la composition de plus de 8 000 produits commercialisés. Ceux-ci bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par le ministre en charge de l'Agriculture, après une procédure d'évaluation du risque pour le consommateur, l'utilisateur et l'environnement. Ainsi, si régulièrement des substances sont interdites à l'usage, parallèlement de nouvelles substances sont autorisées. En fonction des conditions d'utilisation et selon les caractéristiques du milieu, ces substances actives sont susceptibles de se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement (air, sol, eau, sédiments, etc.), ainsi que dans les denrées alimentaires. Compte tenu des risques qu'ils représentent tant pour les milieux aquatiques que pour la production d'eau potable, la présence de pesticides dans les cours d'eau et dans les eaux souterraines fait l'objet des suivis réguliers qui n'ont cessé de se renforcer lors de la dernière décennie. Ces suivis mettent en évidence une dispersion importante et une présence généralisée des pesticides dans les milieux aquatiques, le plus souvent en très faibles quantités. Les teneurs en pesticides issues des résultats d'analyse permettent d'établir des concentrations totales en pesticides et, lorsqu'elles existent, de vérifier le respect des normes par substance. Ces normes font partie des objectifs de qualité de la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE (DCE). Cependant, peu d'études s'intéressent à la présence de pesticides dans le milieu marin. La forte dilution et une faible bioaccumulation de la majorité des pesticides sont très certainement des éléments explicatifs de cet état de fait. Cependant, les exemples avec la bioaccumulation de la Chlordécone chez la langouste en Martinique démontre que le milieu marin peut également être sensible à l'influence des bassins versants.

En 2007, 453 pesticides différents ont été recherchés sur au moins une des 2023 stations de suivi de la qualité des cours d'eau en France. Ces stations, sous la responsabilité des Agences de l'Eau, font majoritairement partie des programmes de surveillance mis en place avec la DCE. La perspective d'application de la Directive cadre sur le milieu marin (DCSMM) prévoit également le suivi des mêmes substances prioritaires (Tableau 3) qu'en eau douce. Applicable à partir de 2016 dans la DCSMM, les analyses menées dans le cadre du descripteur D8 des contaminants chimiques et des effets biologiques s'appuieront sur des seuils de concentrations communs à la DCE lorsque les seuils spécifiques au milieu marin manqueront pour certains composés.

Tableau 3. Les 41 substances surveillées dans le cadre de la DCE suivant les seuils NQE : norme de qualité environnementale (Directive 2008/105/CE)

	N°UE DCE	Nom de la substance	NQE-MA (µg/l)	NQE-CMA (µg/l)
PESTICIDES	1.	Alachlore	0,3	0,7
	3.	Atrazine	0,6	2
	8.	Chlorfenvinphos	0,1	0,3
	9.	Chlorpyrifos	0,03	0,1
	13.	Diuron	0,2	1,8
	14.	Endosulfan (total)	0,005	0,01
		alpha Endosulfan	$\Sigma = 0,005$	$\Sigma = 0,01$
		béta Endosulfan		
	17.	Hexachlorobutadiène	0,1	0,6
	18.	Hexachlorocyclohexane	0,02	0,04
		alpha Hexachlorocyclohexane	$\Sigma = 0,02$	$\Sigma = 0,04$
		gamma isomère - Lindane		
		beta Hexachlorocyclohexane		
		delta Hexachlorocyclohexane		
	19.	Isoproturon	0,3	1
	26.	Pentachlorobenzène	0,007	s. o.
	29.	Simazine	1	4
	33.	Trifluraline	0,03	s. o.
METAUX LOURDS	6.	Cadmium et ses composés	0,25	1,5
	20.	Plomb et ses composés	7,2	s. o.
	21.	Mercure et ses composés	0,05	0,07
	23.	Nickel et ses composés	20	s. o.
POLLUANTS INDUSTRIELS	2.	Anthracène	0,1	0,4
	4.	Benzène	10	50
	5.	Pentabromodiphényléther	0,0005	s. o.
	7.	Chloroalcanes C10-C13	0,4	1,4
	10.	1,2 Dichloroéthane	10	s. o.
	11.	Dichlorométhane	20	s. o.
	12.	Di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP)	1,3	s. o.
	22.	Naphtalène	2,4	s. o.
	24.	Nonylphénols	0,3	2
	25.	Para-tert-octylphénol	0,1	s. o.
	32.	Trichlorométhane (chloroforme)	2,5	s. o.
	6.	Tétrachlorure de carbone	12	s. o.
	7.	Tétrachloroéthylène	10	s. o.
	8.	Trichloroéthylène	10	s. o.

¹ Directive 2008/105/CE du 16 décembre 2008 (également appelé Directive Fille) établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE

Parmi les pesticides, les herbicides de type phénylurée, de la famille des urées substituées, constituent les herbicides les plus utilisés en agriculture. Ils peuvent aussi être utilisés comme algicides dans les peintures anti-fouling. Leur mode d'action consiste à inhiber le transport des électrons au niveau de la photosynthèse (photosystème II) (Dodge, 1989). Parmi ces herbicides, le diuron et l'isoproturon ont été classés par la DCE comme des substances à étudier de manière prioritaire, car ce sont des carcinogènes, et des perturbateurs endocriniens.

Différentes études ont révélé que ces herbicides modulent différents paramètres impliqués dans les mécanismes de défense immunitaire chez *C. gigas* (Tableau 4). Des effets ont été observés également sur la structure de l'ADN (Bouilly *et al.* 2007 ; Huvet *et al.*, 2008 ; Akcha *et al.*, 2012), la morphologie de l'épithélium du tubule digestif et la reproduction (Buisson *et al.*, 2008). Les pesticides organochlorés (OCP), tels que le Dichloro Diphényl Trichloroéthane (DDT), le lindane et la dieldrine, sont classés comme des Polluants Organiques Persistants (POP), du fait de leurs caractères toxique, bioaccumulable, mutagène et tératogène. Le DDT est aujourd'hui interdit à la vente. Il est cependant toujours détecté par les réseaux de surveillance dans la chair des huîtres. Leurs effets sur *C. gigas* ne sont pas connus. Les pesticides organophosphorés, qui ont remplacé les organochlorés, et les carbamates agissent en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE) et les carboxylestérases (CE) (Cooreman *et al.*, 1993). Ce type d'insecticide ne semble pas avoir d'effet ou des effets très limités sur les cholinestérases des branchies de *C. gigas* (Bocquené *et al.*, 1997). En revanche, des organophosphorés tels que le glyphosate sont capables de moduler l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques dont les mécanismes de défense immunitaire (Tanguy *et al.*, 2005). Enfin, des fongicides tels que le chlorothalonil ont des effets sur différents paramètres hématocytaires chez *C. gigas* (Tableau 4).

Tableau 4. Effets des pesticides sur les mécanismes de défense immunitaire chez l'Huître creuse, *Crassostrea gigas* (modifié d'après Luna-Acosta 2010)

Mécanisme de défense affecté	Pesticides	Effet observé	Références
Paramètres hémocytaires			
Agrégation hémocyttaire	(Atrazine, diuron, isoproturon)	↓	Auffret & Oubella 1997b
Cellules positives pour les estérases	Paraoxon	↓	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
Mortalité cellulaires	2,4 D	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	Chlorothalonil	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	Diuron	↑	Bouilly <i>et al.</i> , 2007
	(Atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2007
Phagocytose	(Atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> , 2007
	Diuron	↑	Bouilly <i>et al.</i> , 2007
Pourcentage des granulocytes	Chlorothalonil	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	(Atrazine, diuron, isoproturon)	↑	Bouilly <i>et al.</i> , 2007
Production de ROS	Chlorothalonil	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	(Atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2007
	Diuron	↑	Bouilly <i>et al.</i> , 2007
Présence de lysosomes ou relargage enzyme lysosomale	Paraoxon	↓	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	Diuron	↑	Bouilly <i>et al.</i> , 2007

Mécanisme de défense affecté	Pesticides	Effet observé	Références
Paramètres moléculaires			
Gènes impliqués dans les mécanismes de défense immunitaire	(Atrazine, diuron, isoproturon, glyphosate)	↑ / ↓	Tanguy <i>et al.</i> , 2005
	(Atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> , 2007
Paramètres physiologiques			
Sensibilité à un challenge bactérien	(Atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> , 2007

Chapitre I :

**Effets de pesticides sur les activités
hémocytaires chez l'huître creuse,
*Crassostrea gigas***

1. Sélection des pesticides

La sélection de molécules d'intérêt (pesticides) a été une première étape de ce travail de thèse. Quatorze pesticides les plus représentatifs des milieux aquatiques (retrouvés dans différentes régions littorales françaises), mais également les plus toxiques potentiellement pour l'huître creuse ont été ainsi choisis pour étudier leurs effets en mélange (Carbaryl, Fosetyl Aluminium, Alachlore, Métolachlore, Glyphosate, Atrazine, Terbutylazine, Diuron, AMPA, Bentazone, Tebuconazole, Imidaclopride, Mancozèbe et Métaldéhyde). Ce mélange a également été inspiré de celui utilisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (Ifremer, La Tremblade) dans le cadre de la thèse de B. Gagnaire (Carbaryl, Fosetyl Al., Alachlore, Métolachlore, Glyphosate, Atrazine, Terbutylazine et Diuron) (Gagnaire, 2006).

Différents types de molécules ayant des effets variés ont été sélectionnés (herbicides, fongicides, insecticides et molluscicides). Le choix des pesticides s'est appuyé sur différents critères de présence, concentrations, usages et toxicité dans le milieu et suivant les documents disponibles : Directive cadre sur l'eau (2000/60/CE), le code de la santé publique, le plan écophyto 2018 Poitou-Charentes, le bilan 2010 du suivi de pesticides en Poitou-Charentes et en Bretagne « CORPEP Bretagne, qualité des eaux ». Plusieurs documents rapportent en particulier les différents pesticides retrouvés notamment en Poitou-Charentes et en Bretagne (Barrault, « Suivi de la qualité des eaux superficielles vis-à-vis des pesticides », 2006, Kaczmaryk, plan écophyto2018 : « Contamination de l'environnement par les produits phytosanitaires en Poitou-Charentes » 2006-2010, Réseau CORPEP., « Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes », 2010, 2009 et 2008).

Un suivi de la qualité des eaux superficielles vis-à-vis des pesticides a été réalisé en 2005 et 2006 en Poitou-Charentes qui est intégrée en partie dans le secteur du bassin Loire-Bretagne. Le bassin Loire-Bretagne représente plus d'un quart du territoire métropolitain (155 000 km²), 36 départements et dix régions concernées, soit en totalité comme la Bretagne, soit partiellement comme la région Poitou-Charentes. Le bassin Loire-Bretagne correspond au bassin de la Loire et de ses affluents (120 000 km²), au bassin de la Vilaine et aux bassins côtiers bretons et vendéens.

Le document rapporte qu'en 2006, comme en 2005, les molécules les plus souvent quantifiées sont l'**atrazine déséthyl** (métabolite de l'atrazine), l'**atrazine**, l'**AMPA** (métabolite du

glyphosate), le **diuron**, le **métolachlore** et le **glyphosate**. L'**atrazine** (interdite depuis 2003) et l'**atrazine déséthyl** (produit de dégradation) sont retrouvés, avec en général des teneurs autour de 0,03 µg/L. Le **glyphosate** et/ou son métabolite l'**AMPA** ont été mesurés à des concentrations importantes dans une majorité de stations à l'occasion des différentes campagnes de suivi. Le glyphosate est la substance active la plus vendue en quantité dans la région. Il est autorisé pour de nombreux usages agricoles et non agricoles. Le **diuron**, urée substituée utilisée pour le désherbage des cultures pérennes et des zones non agricoles, a été mis en évidence principalement en mai et aussi en juillet et octobre 2006. Les teneurs mesurées sont fréquemment supérieures à 0,1 µg/L.

Le métaldéhyde est un produit molluscicide autorisé sur toutes cultures, qui a été retrouvé à l'occasion des campagnes d'octobre et/ou décembre 2006 sur huit stations. Les concentrations mesurées varient entre 0,05 µg/L et 0,20 µg/L. Le métaldéhyde est le molluscicide le plus utilisé, c'est un déshydratant qui provoque chez les mollusques l'émission d'un mucus très abondant. Au regard des cibles (escargots et limaces) et du mode d'action de cette molécule, elle semble potentiellement plus toxique pour l'huître creuse que d'autres pesticides (herbicides ou fongicides). Métaldéhyde (2,4,6,8-tétraméthyl-1,3,5,7-tetraoxocanemetaldehyde) est un composé organique qui agit sur les mucocytes des glandes salivaires et épidermique. Il induit également des lésions sur les membranes cellulaires et des dommages irréversibles dans les mitochondries et les noyaux (Nielsen, 1988). Ces actions font qu'il est impossible pour les gastéropodes de se réhydrater. Dès l'ingestion ou contact avec le métaldéhyde, l'animal cesse de s'alimenter. La mort survient en six heures dans des conditions sèches et 24 heures dans des conditions humides (Nielsen, 1988 ; Triebskorn *et al.*, 1996).

2. Articles

La première partie de cette thèse est consacrée à l'étude des effets de pesticides sur les capacités hématocytaires de l'huître creuse (*in vitro* et *in vivo*). Les effets des pesticides sélectionnés (seul ou en mélange) ont été explorés au travers de la cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont rapportés sous forme de deux articles (Article n°1 pour des résultats obtenus *in vitro* et article n°2 pour des résultats obtenus *in vivo*). Dans ce chapitre, l'ensemble des travaux a été réalisé sur des hématocytes d'huître creuse. En effet, le prélèvement d'hémolymphe étant facilement réalisable, la première étude en conditions *in vitro* a permis d'obtenir des réponses rapides concernant les effets des pesticides sur les hématocytes et de tester plusieurs conditions (durée d'exposition, concentrations des pesticides, familles d'huîtres différentes). Il a été également choisi de réaliser les tests sur une courte durée (21 heures). En effet, il a été montré que la présence de pesticides dans l'environnement marin peut être fugace. Il est donc apparu adapté de réaliser des contacts courts afin d'explorer les effets de pesticides. De plus, du fait de la difficulté de maintenir les hématocytes en condition *in vitro* sur de longues périodes, la durée des expériences a été de 21 heures au maximum (Article n°1). Pour les expériences réalisées *in vivo*, il a été choisi de tester également un temps d'exposition court, d'une durée de 24 heures, pouvant correspondre à des arrivées soudaines de pesticides dans le milieu marin, phénomènes effectivement observés dans l'environnement (Article n°2).

Des animaux appartenant à trois familles bi-parentales d'huître creuse, *C. gigas*, produites à l'Ifremer et présentant des sensibilités variables à l'infection à OsHV-1 en conditions expérimentales, ont été sélectionnées pour tester leur sensibilité aux pesticides aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Il s'agit de deux familles (n° 11 et 32) présentant 30% de mortalité et d'une famille (n° 29) présentant 86% de mortalité lors d'une infection expérimentale à OsHV-1. Il a en particulier été choisi des familles présentant des mortalités modérées (familles n°11 et 32) afin de pouvoir appréhender un possible effet négatif des pesticides sur la survie chez les animaux expérimentalement infectés.

Article 1 : “Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays”

Afin de mieux comprendre l'impact de certains pesticides détectés dans les eaux françaises, leurs effets sur les hémocytes d'huître creuse ont été étudiés après des expositions de courte durée dans des expériences réalisées *in vitro*. L'immunité des bivalves fait intervenir principalement des cellules spécialisées, les hémocytes, qui éliminent les agents pathogènes par phagocytose (Cheng, 1981; Feng, 1988) et produisent des composés comme des enzymes lysosomales et des molécules antimicrobiennes contribuant à la destruction des agents infectieux (Coles et Pipe, 1994).

Les hémocytes d'huître creuse ont été prélevés dans le sinus hémolympatique du muscle adducteur et incubés, soit avec le métaldéhyde, soit avec un mélange de 14 pesticides. Les tests effectués ont consisté à étudier l'effet du mélange de 14 pesticides (concentrations de 1X à 100X) et du métaldéhyde seul (jusqu'à 1g/L), *in vitro* sur les hémocytes d'huître creuse (familles n° 11, n° 29 et n°32). Différents paramètres hémocytaires ont été suivis en cytométrie en flux : la taille et la complexité des hémocytes, la mortalité hémocytaire, la présence d'estérases non spécifiques et l'activité de phagocytose.

Un pool unique d'hémolymphes filtrées (60µm) a été réalisé à partir de 50 individus, puis réparti de la même manière dans des tubes « témoin » et « pesticides ». Après mise en contact avec les pesticides, les tubes ont été placés à 15 - 16°C dans une étuve à l'obscurité pendant 21h. Un suivi des activités hémocytaires en cytométrie en flux a été réalisé au temps 2h, 4h et 21h en utilisant les protocoles suivants :

- Pour mesurer la mortalité hémocytaire, 200 µL d'hémolymphes ont été incubés avec 10 µL d'iodure de propidium pendant 30 minutes sur glace à l'obscurité.
- Les activités estérases non spécifiques ont été recherchées dans 200 µL d'hémolymphes après incubation de 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante avec 1 µL de diacétate de fluorescéine (FDA).

- L'activité de phagocytose a été suivie dans 200 µL d'hémolymphes additionnés de 10 µL de billes fluorescentes de 1 µm de diamètre (ratio billes/hémocytes : 700/1) avec une incubation de deux heures à l'obscurité à température ambiante.
- La taille et la complexité ont été mesurées avec 200 µL d'hémolymphes incubés 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

Aucun effet significatif entre les conditions « témoin » et « pesticides » n'a été observé pour les hémocytes provenant d'huîtres appartenant aux trois familles bi-parentales testées quels que soient les temps et les concentrations utilisées pour les pesticides en mélange. Concernant les effets du métaldéhyde seul, les résultats sont identiques à ceux obtenus avec le mélange de pesticides (aucun effet). Un contrôle correspondant à une salinité de 6.5 ‰ a permis d'observer des effets sur les paramètres hémostatiques suivis et de confirmer la validité des protocoles utilisés.

Ainsi, pour l'ensemble des concentrations testées (mélange de 14 pesticides (de 1X à 100X) et du métaldéhyde seul (de 0,1 µg/L à 1g/L)), aucun effet n'a été observé sur les paramètres hémostatiques suivis. Ces observations sont en accord avec des résultats rapportés dans la littérature (Gagnaire *et al.*, 2006a) n'ayant montré un effet d'un mélange de pesticides qu'à de très fortes concentrations. Les hémocytes de mollusque maintenus *in vitro* ont la capacité de modifier très rapidement différents paramètres physiologiques (Le Foll *et al.*, 2010). Ils semblent ainsi montrer une grande résistance à différentes conditions de stress (Gagnaire *et al.*, 2006b), ce qui implique (1) de développer de nouveaux paramètres pour caractériser les capacités d'adaptation des hémocytes et (2) illustre l'intérêt de développer en parallèle des modèles d'exposition en condition *in vivo*.

Environmental Science and Pollution

Archimer

Research

Article in Press

Acceptation date : January 2013

<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-1931-3>

© 2013, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

<http://archimer.ifremer.fr>

The original publication is available at <http://www.springerlink.com>

Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term *in vitro* assays

Pierrick Moreau^{1*}, Thierry Burgeot² and Tristan Renault¹

¹ Ifremer (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer), Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, 17390 La Tremblade, France

² Ifremer (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer), Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

*Corresponding author: Pierrick Moreau, pierrick.moreau@ifremer.fr

Abstract

Pesticides are frequently detected in estuaries among the pollutants found in estuarine and coastal areas and may have major ecological consequences. They could endanger organism growth, reproduction or survival. In the context of high mortality outbreaks affecting Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France since 2008, it appears of importance to determine the putative effects of pesticides on oyster susceptibility to infectious agents. Massive mortality outbreaks reported in this species, mainly in spring and summer, may suggest an important role played by the seasonal use of pesticides and freshwater input in estuarine areas where oyster farms are frequently located. To understand the impact of some pesticides detected in French waters, their effects on Pacific oyster hemocytes were studied through short-term *in vitro* experiments. Bivalve immunity is mainly supported by hemocytes eliminating pathogens by phagocytosis and producing compounds including lysosomal enzymes and antimicrobial molecules. In this study, oyster hemocytes were incubated with a mixture of 14 pesticides and metaldehyde alone, a molecule used to eliminate land mollusks. Hemocyte parameters including dead/alive cells, non-specific esterase activities, intracytoplasmic calcium, lysosome number and activity and phagocytosis were monitored by flow cytometry. No significant effect of pesticides tested at different concentrations was reported on oyster hemocytes maintained *in vitro* for short-term periods in the present study. It could be assumed that these oyster cells were resistant to pesticide exposure in tested conditions and developing *in vivo* assays appears as necessary to better understand the effects of pollutants on immune system in molluscs.

Key Words: immunity, hemocytes, pesticides, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, flow cytometry, bivalve

1. Introduction

Estuaries are considered among the most productive environments in the world. They serve as nurseries for juveniles of economically important fish and invertebrate larvae, and they also rank among the most contaminated areas. Pesticides have become more frequently detected among the pollutants found in estuarine and coastal areas (Renault, 2011; Masuda *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 2012). Pesticides may have major ecological consequences and could endanger organism growth, reproduction or survival (Banerjee *et al.*, 1996). France is one of the first European users of pesticides for agriculture purposes. Given their extensive use and the different pathways of these molecules in watersheds, many pesticides are found in French coastal waters, especially in the different basins of oyster production. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, given its phylogenetic position and its economic relevance in aquaculture at a national and international level appears as a model of choice to define the importance of the immune system as a target of pollutants in invertebrates. In the context of high mortality outbreaks affecting Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France since 2008, it appears of importance to study the putative effects of pesticides on oyster susceptibility to infectious agents. The effects of environmental contaminants may result from direct toxic actions on tissues or cells or from alterations of the homeostatic mechanisms including the immune system (Coles & Pipe, 1994; Carajaville *et al.*, 1996). Among all physiological processes possibly disturbed by pollutants, the immune system is likely to be particularly sensitive (Baier-Anderson & Anderson, 2000; Fournier *et al.*, 2000). It has been shown, in vertebrates and invertebrates, that pesticides are capable of diminishing immune defenses and/or of modifying genomes (Vial *et al.*, 1996; Kouassi *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 2001). It has been also suggested that bivalves may be weakened as a result of the presence of these pollutants, and thus become more vulnerable to infectious diseases (Ross *et al.*, 1996; Gagnaire *et al.*, 2007).

To understand the impact of pesticides detected in French waters, their effects on Pacific oyster hemocytes were studied through short-term *in vitro* experiments in the present study. Bivalve immunity is mainly supported by hemocytes that eliminate

pathogens by phagocytosis (Cheng, 1981; Feng, 1988) and produce compounds including lysosomal enzymes and antimicrobial molecules which contribute to pathogen destruction (Coles & Pipe, 1994). Oyster hemocytes were collected in the adductor muscle sinus and incubated either with metaldehyde which is used to kill land mollusks or a mixture of 14 pesticides. In order to reveal potential effects of pesticides, hemocyte parameters including dead/alive cells, non-specific esterase activities, intracytoplasmic calcium, lysosome number and activity and phagocytosis were monitored by flow cytometry.

2. Materials and methods

2.1. Oysters and hemocyte collection

In order to reduce the impact of inter-individual variability on the assessment of hemocyte parameters, Pacific oysters aged less than one year from 3 bi-parental families (Families n° 11, n° 29 and n° 32) were used in the present study. They were produced simultaneously and reared under similar conditions at the Ifremer's facilities (LGPM La Tremblade, France), as part of the European project Bivalife (FP7, 2011-2014, GA n°266157).

Oyster hemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus through a notch ground in the oyster shell, using a 1ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25mm). Hemolymph samples were filtered on a 60 µm mesh to eliminate debris. Hemocytes were counted with a Malassez cell and kept on ice until use to avoid cell aggregation. Pools of cells from 50 oysters were used to provide enough hemocytes to carry out experiments.

2.2. Pesticides

Fourteen pesticides were selected based on their detection in the aquatic environment in Brittany and in Charente Maritime and on their immunotoxic potential for invertebrates (Galloway & Handy, 2003; Tanguy *et al.*, 2005; Gagnaire *et al.*, 2007; Menin *et al.*, 2008; Luna-Acosta *et al.*, 2011). They belong to 4 pesticide groups: herbicides,

fongicides, insecticides, and molluscicides. A mixture of 14 pesticides (Table 1) was tested as well as metaldehyde alone. Solvents were used as recommended by manufacturers (Table 1) and final solvent concentration was less than 0.5% in order to avoid disturbance of hemocyte parameters. All pesticides were purchased from Fluka and Supelco (Sigma-Aldrich).

2.3. Flow cytometry

Oyster hemocyte activities were monitored using flow cytometry (EPICS® XL flow cytometer). For each sample, 5000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Results were depicted as cell cytograms indicating cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used. A gate was defined on the basis of FSC value in order to eliminate cell debris. To measure hemocyte mortality, 200 µL of hemolymph were incubated with 10 µL of propidium iodide for 30 min on ice in the dark (Gagnaire *et al.*, 2003). Non-specific esterase activities were investigated in 200 µL of hemolymph after 30 min incubation in the dark at room temperature with 1 µL of FDA (fluorescein diacetate) (Gagnaire *et al.*, 2003). Intracytoplasmic calcium was monitored in 200 µL of hemolymph added with 1 µl of Fluo-4 AM (Life Technologies: Fluo-4, AM, cell permeant) at 5 mM (1h 30 min incubation in the dark at room temperature) (Aton *et al.*, 2006). The presence and the number of lysosomes were measured in 200 µL of hemolymph supplemented with 1 µl of LysoTracker® (Invitrogen: LysoTracker® Green DND-26) to 1 mM (2h incubation in the dark at room temperature) (Gagnaire *et al.*, 2003). Lastly, the phagocytic activity was followed in 200 µL of hemolymph supplemented with 10 µL of beads 1 µm in diameter (ratio bead / hemocyte: 700/1) with a 2 hour incubation in the dark at room temperature. Cell size and complexity were measured in 200 µL of hemolymph incubated for 30 min in the dark at room temperature without any treatment (Gagnaire *et al.*, 2003).

2.4. Experimental designs

2.4.1. *Test of different times of incubation with the pesticides mixture*

Initial assays aimed at evaluating *in vitro* the effect of a mixture of 14 pesticides on oyster hemocytes (Family n° 11) after different incubation times. The parameters that were assessed by flow cytometry included: cell size and complexity (data not shown), hemocyte mortality, non-specific esterases (data not shown), intracytoplasmic calcium, presence and activities of lysosomes and phagocytic activity. The concentration that was tested (1X) corresponded to realistic concentrations reported in the environment (Table 1).

Oyster hemocytes were incubated with the pesticide mixture during 21h and sampled at 3 times: 2h, 4h and 21h. A single pool of filtered hemolymph was prepared from 50 individuals and distributed in tubes including one "control" (the control was not exposed to pesticides, but it corresponds to the same quantity of solvent used for testing the pesticide mixture). After adding the pesticide mixture, tubes were placed at 16°C in an incubator in the dark during 21h. The experiment was repeated three times with 50 oysters for each experiment. Family n° 32 was also tested (data not shown).

2.4.2. *Test of different concentrations of the pesticide mixture*

Assays were also carried in order to study the effects of the pesticide mixture at different concentrations. Hemocytes were collected from oysters belonging to Family n° 29, and different hemocyte parameters were measured by flow cytometry: cell size and complexity (data not shown), hemocyte mortality, presence of non-specific esterases (data not shown), intracytoplasmic calcium, presence and activities of lysosomes and phagocytic activity.

Concentrations tested (1X : environmentally relevant concentrations) correspond to realistic concentrations reported in the environment (Table 1) and concentrations 10, 50 and 100 times higher (Table 1). The incubation with the pesticide mixture was 4h as hemocyte mortality was reported in controls for longer incubation periods. After contact with pesticides, tubes were placed at 16°C in an oven for 4 hours in the dark. Hemocyte activities were measured by flow cytometry. The experiment was repeated three times

with 50 oysters for each experiment. Concentration 1000X was also tested (data not shown).

2.4.3. Test of metaldehyde alone

Assays were performed in order to test metaldehyde effects at high concentrations: 100 mg / L and 1000 mg / L with an incubation period of 4 hours and hemocytes were collected at the same time. Hemocytes were collected from oysters belonging to Family n° 29, and different hemocyte parameters were measured by flow cytometry: cell size and complexity (data not shown), hemocyte mortality, presence of non-specific esterases, intracytoplasmic calcium (data not shown), presence and activities of lysosomes (data not shown) and phagocytic activity (data not shown). Safety data sheet Sigma-Aldrich reports EC50 test on 1 *Daphnia* specie allowing to define a value at 90 mg/L for *Daphnia magna* after a 48h exposure. The experiment was repeated twice with 50 oysters for each experiment. A control with a salinity of 6.5 ‰ was added to check the validity of the protocols. Haemolymphs containing hemocytes were resuspended in a haemolymph-distilled water mixture (haemolymph / distilled water: 1vol / 4vol) in order to obtain a salinity at 6.5‰.

2.5 Statistical analysis

Results were expressed as percentage of positive cells. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon - Mann Whitney test by statistical software R, to compare two groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare more than two groups. The null hypothesis (H0) corresponding to the distribution of the quantitative variable is the same in the groups. Significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**).

3. Results

3.1. Test of different times of incubation of the pesticide mixture

Regardless of sample collection time, incubation of the hemocytes with the pesticide mixture did not have any significant effect on the tested parameters (Figs. 1 and 2). However, differences related to collection time were observed, as hemocyte mortality after a 21h incubation period was 3 times higher than after a 2h or a 4h incubation

period (Figs. 1a, 1b and 1c). Cell mortality at 21h (Figs. 1a and 1c) was high (around 45%) in controls avoiding measurement of hemocyte activities. It was therefore decided to select a single sampling time for the following experiments using a range of concentrations (1X, 5X, 10X and 100X) (Table 1). No significant effect was observed between the different conditions for intracytoplasmic calcium (Fig. 2a), presence and activities of lysosomes (Fig. 2c) and phagocytic activity (Fig. 2e). Only one difference is observed for phagocytosis between 2h and 4h (Fig. 2e). These two times are fairly close and with almost no difference, it was decided to keep only the 4h time for the next experiments. Family n° 32 was also tested (data not shown) and results were similar to those obtained for Family n° 11.

3.2. Test of various concentrations of pesticides

No significant effect was reported on any of the hemocyte activities tested, regardless of pesticide concentration (1X to 100X) (Table 1) as a mixture, between control hemocytes and pesticide treated ones (Fig. 3). Hemocyte mortality was less than 8% for control hemocytes and pesticide treated ones (Fig. 3a). Concentration 1000X was also tested (data not shown) and results were similar to those obtained for other concentrations.

3.3. Test of metaldehyde alone

Neither of the tested metaldehyde concentrations had a significant effect on oyster hemocytes (Family n° 29) (Figs. 4a and 5a). Results were similar to those obtained with the pesticide mixture (no effect) and validated thanks to the controls included in each experiment. Oyster hemocytes were incubated at a 6.5‰ salinity. Low salinity allowed to observe significant effects on hemocyte parameters including cell mortality (Figs. 4 and 5). Hemocyte mortality was 6 times higher at 6.5‰ salinity compared to other conditions and control (Figs. 4a and 4b). This significant increase ($p < 0.01$) of cell mortality was also related to changes in terms of non-specific esterase activities (Figs. 5a, 5b and 5c), with a significant increase of the cell population (pop 1) showing no or low fluorescence (dead cells) (Fig. 5). A significant reduction ($p < 0.01$) from the 2 other cell populations (alive cells) (Fig. 5) was also observed.

3. Discussion

In the present work, it was decided to study the putative effects of pesticides using a mixture of 14 different molecules in order to better represent aquatic environments where a variety of substances may be simultaneously present (Gagnaire *et al.*, 2006a; Renault, 2011) including herbicides and their metabolites (Lanyi & Dinya, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Vargha *et al.*, 2005). In contrast metaldehyde was tested individually, as this molluscicide substance known to be toxic for snails (Dai *et al.*, 2011) has the potential to display high toxicity for oysters.

In this work using 3 bi-parental families, Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte mortality and cell activities were not affected by pesticides in short-term *in vitro* assays. However, a low salinity (6.5‰ versus 25‰ to 35‰ salinity in the field) had a measurable effect on hemocytes which confirmed the validity of the protocols used in the present study. These observations are consistent with results from the literature, showing an effect of a pesticide mixture on phagocytosis only at high concentrations, higher than those tested in the present study (Gagnaire *et al.*, 2006a). Another study showed that only extreme temperature and salinity conditions had an impact on Pacific oyster hemocytes maintained *in vitro* (Gagnaire *et al.*, 2006b).

The lack of noticeable effects of the pesticide mixture on oysters hemocytes could be partially explained by antagonistic effects between some of the substances, similar to those reported for diuron and its metabolites (Knauert *et al.*, 2008; Pesce *et al.*, 2010; Neuwoehner *et al.*, 2010). It could also be related to the parameters selected to assess hemocyte activities: cell mortality, non-specific esterase activities, lysosome detection, intra-cytoplasmic calcium and phagocytic activity. However, previous studies showed modulation of these parameters including phagocytosis. In the eastern oyster, *C. virginica*, reduced phagocytosis activity was observed after exposure to trifluralin (Alvarez and Friedl, 1992) and to the insecticide Chlordan at 250 µM *in vitro* (Larson *et al.*, 1989) which is higher than the concentrations used in the present study. Moreover, Canty *et al.* (2007) reported a decrease in phagocytic index in the blue mussel, *Mytilus edulis*, after a short exposure to 0.1 mg.L⁻¹ azamethiphos suggesting that azamethiphos can modulate hemocyte functions in mussels at environmentally relevant concentrations. On the contrary, Gagnaire *et al.* (2003) reported no effect on cell

viability, cell cycle and cellular activities except for peroxidase activity in Pacific cupped oyster hemocytes exposed to atrazine *in vitro*. On the contrary, effects have been reported in *in vivo* conditions on these parameters (Gagnaire *et al.*, 2007).

Monitoring of hemocyte parameters may be compromised by high inter-individual variability (Ordás *et al.*, 2000; Ford & Paillard, 2007). In order to address this issue and minimize effects related to the genetic diversity, animals belonging to 3 hatchery-reared bi-parental families rather than oysters collected from the field were used as biological material.

The short exposure times that were used in the present experiments could partially account for the observed results. However, aquatic organisms have displayed susceptibility to short-term exposure to herbicides under laboratory controlled conditions (Bretaud *et al.*, 2000; Saglio *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2006a and b). Moreover, in the natural aquatic environment, peak concentrations are often found for short periods of time (Munaron, 2006; Hyne *et al.*, 2008). Although pesticides may demonstrated some effects on hemocytes after long exposure in *in vivo* experiments (Patetsini *et al.*, 2013), testing of long exposure period is difficult in *in vitro* assays as hemocytes do not survive for long time outside of oysters.

Although levels of pesticides measured in superficial waters generally range below lethal concentrations for aquatic species, several studies concerning the effects of pesticides in bivalves have been carried out using high pollutant concentrations. In the present study, pesticides were tested at environmentally relevant concentrations in order to document putative sub-lethal adverse effects. The lack of impact of pesticide exposure on hemocytes could be attributed to the low concentrations of pesticides that were used. However, this hypothesis appeared as not relevant as no effect was also observed on the assessed parameters when higher concentrations were tested.

Short-term exposure of hemocytes to different concentrations of pesticides had no significant effect on the assessed parameters, suggesting, that these cells have some level of resistance towards pesticides *in vitro*, under the tested conditions. This hypothesis is supported by data from the full genome sequencing of the Pacific oyster, which reveals the existence of stress adaptation in particular through the transcription of

a large set of genes as a response to stressful environmental conditions (Zhang *et al.*, 2012). As an example, 88 genes encoding heat shock proteins 70 (HSP70), which have crucial roles in protecting cells against heat and other stresses, were identified in the Pacific oyster genome, compared with ~17 in humans and 39 in sea urchins. Moreover, genomic and transcriptomic analyses of different biological processes such as apoptosis highlight the sophisticated genomic adaptations of this bivalve species to sessile life in a highly stressful environment (Zhang *et al.*, 2012).

As a conclusion, it appears useful to carry out *in vivo* experiments to study the effects of short-term exposure to pesticide mixtures and to define models of immune-modulation. Such models could improve our understanding of the complex interactions between Pacific oysters, pathogens and the environment including pesticides. Although a relationship between pollution and an increased susceptibility towards infectious diseases has been established in vertebrates (Fournier *et al.*, 1988; Van Levoren *et al.*, 2000; Jepson *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008), few studies have been devoted to invertebrates (Galloway & Depledge, 2001). Few studies have attempt to link contaminants and susceptibility to pathogens in marine molluscs (Anguiano *et al.*, 2007; Gagnaire *et al.*, 2007; Collin *et al.*, 2010; Greco *et al.*, 2011). Pacific cupped oysters, *Crassostrea gigas*, have been previously used as a model to evaluate the impact of a mixture of pesticides on certain immune-related parameters and to demonstrate the relationship between bacterial infection, the presence of pollutants and the host's defense capacity (Gagnaire *et al.*, 2007). This type of approach appears suitable to further understand the massive mortality outbreaks of Pacific oyster spat that have been reported in France since 2008 (Segarra *et al.*, 2010; EFSA 2010).

Acknowledgments

This work was partially funded through the EU project BIVALIFE (26 61 57) and the Poitou Charentes Region. Thank you to Valerie Barbosa-Solomieu for English editing.

References

- Alvarez MR, Friedl FE. Effects of a fungicide on in vitro hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 1992;107:135–40.
- Anguiano G, Llera-Herrera R, Rojas E, Vazquez-Boucard C. Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to lindane (gamma-HCH) exposure under experimental conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 2007;26:2192–7.
- Aton E, Renault T, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Cognard C, Imbert N. A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca^{2+} in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2006;20:493–502.
- Baier-Anderson C, Anderson RS. The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environ. Res.* 2000;83:72–8.
- Banerjee BD, Koner BC, Ray A. Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian J. Exp. Biol.* 1996;34:723–33.
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health* 2001;16:1–40.
- Brethead S, Toutant JP, Saglio P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000;47:117–24.
- Cajaraville MP, Olabarrieta I, Marigomez I. In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1996;35:253–60.
- Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, Cooper L, Galloway TS. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 2007;54:396–402.

- Cheng T.C. Bivalves. N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley (Eds.), Invertebrate Blood Cells, Academic Press, London. 1981; pp. 233–299.
- Coles JA, Pipe RK. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology 1994;4:337–52.
- Collin H, Meistertzheim A-L, David E, Moraga D, Boutet I. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. J. Exp. Biol. 2010;213:4010–7.
- Dai L, Wang W, Dong X, Hu R, Nan X. Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2011;32:226–32.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. EFSA Journal 2010;8(11):1894.
- Feng SY. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am Fish Soc Spec Publ. 1988;18:153–168.
- Ford SE, Paillard C. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol. 2007;23:280–91.
- Fournier M, Chevalier G, Nadeau D, Trottier B, Krzystyniak K. Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. J Toxicol Environ Health 1988;25:103–18.
- Fournier Michel, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. Amer. Zool. 2000;40:412–20.
- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapegue S, Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. Curr. Pharm. Des. 2003;9:193–9.

- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 2006a;22:1–14.
- Gagnaire Beatrice, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon Helene, Renault Tristan. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 2006b;20:536–47.
- Gagnaire Beatrice, Gay M, Huvet A, Daniel J-Y, Saulnier D, Renault Tristan. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 2007;84:92–102.
- Galloway TS, Depledge MH. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 2001;10:5–23.
- Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 2003;12:345–63.
- Greco L, Pellerin J, Capri E, Garnerot F, Louis S, Fournier M, Sacchi A, Fusi M, Lapointe D, Couture P. Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environ. Toxicol. Chem.* 2011;30:132–41.
- Hyne RV, Aistrophe M. Calibration and field application of a solvent-based cellulose membrane passive sampling device for the monitoring of polar herbicides. *Chemosphere* 2008;71:611–20.
- Jepson PD, Bennett PM, Deaville R, Allchin CR, Baker JR, Law RJ. Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005;24:238–48.
- Kim Y, Powell EN, Wade TL, Presley BJ. Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar. Environ. Res.* 2008;65:101–27.

- Knauert S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* 2008;42:6424–30.
- Kouassi, Edouard, Ayotte, Pierre, Roy, Raynald, Fournier, Michel, Revillard, Jean-Pierre. BISE | Effets des contaminants de l'environnement sur le système immunitaire. 2001. Available at: <http://www.inspq.qc.ca/bise/post/2001/04/20/Effets-des-contaminants-de-le28099environnement-sur-le-systeme-immunitaire.aspx#>.
- Lanyi K., Dinya Z. Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *Microchemical Journal* 2003;75:1–13.
- Larson KG, Roberson BS, Hetrick FM. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of aquatic organisms* 1989;6:131–6.
- Luna-Acosta A, Kanan R, Le Floch S, Huet V, Pineau P, Bustamante P, Thomas-Guyon H. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. *Water Res.* 2011;45:4103–18.
- Masuda M, Satsuma K, Sato K. An environmental fate study of methoxychlor using water-sediment model system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012;76:73–7.
- Menin A, Ballarin L, Bragadin M, Cima F. Immunotoxicity in ascidians: antifouling compounds alternative to organotins - II. The case of Diuron and TCMS pyridine. *J Environ Sci Health B* 2008;43:644–54.
- Munaron D, Dubernet JF, Delmas F, Stanisière JY, Scribe P. Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay 2006. <http://cemadoc.irstea.fr/cemoa/PUB00022983>.

- Neuwoehner J, Zilberman T, Fenner K, Escher BI. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 2010;97:58–67.
- Patetsini E, Dimitriadis VK, Kaloyianni M. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquatic Toxicology* 2013;126:338–45.
- Pesce S, Lissalde S, Lavieille D, Margoum C, Mazzella N, Roubéix V, Montuelle B. Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquat. Toxicol.* 2010;99:492–9.
- Ordás MC, Ordás A, Beloso C, Figueras A. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2000;10:597–609.
- Renault T. Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know? In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. InTech; October 3, 2011.
- Ross MW. Managing HIV. Part 3: Mechanisms of disease. 3.8 How psychosocial aspects of HIV infection can affect health. *Med. J. Aust.* 1996;164:235–7.
- Saglio P, Bretaudeau S, Rivot E, Olsén KH. Chemobehavioral Changes Induced by Short-Term Exposures to Prochloraz, Nicosulfuron, and Carbofuran in Goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;45:515–24.
- Savage C, Thrush SF, Lohrer AM, Hewitt JE. Ecosystem services transcend boundaries: estuaries provide resource subsidies and influence functional diversity in coastal benthic communities. *PLoS ONE* 2012;7:e42708.
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 2010;153:92–9.

- Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, Walker A, Aamand J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. FEMS Microbiol. Ecol. 2003;45:1–11.
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. FEBS J. 2005;272:390–403.
- Van Loveren H, Ross PS, Osterhaus AD, Vos JG. Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. Toxicol. Lett. 2000;112-113:319–24.
- Vargha M, Takáts Z, Márialigeti K. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. Water Res. 2005;39:1560–8.
- Vial T, Nicolas B, Descotes J. Clinical immunotoxicity of pesticides. J Toxicol Environ Health 1996;48:215–29.
- Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 2012;490:49–54.

Figure legends

Figure 1. Hemocyte activities after exposure to the pesticides mixture at 1X concentration for Family n° 11
 (a) Hemocyte mortality percentage after 2h, 4h and 21h exposure periods to pesticides. (b) Flow cytometry cytogram demonstrating cells mortality percentage after a 4h exposure period. (c) Flow cytometry cytogram demonstrating cells mortality percentage after a 21h exposure period

Figure 1

Fig. 1a

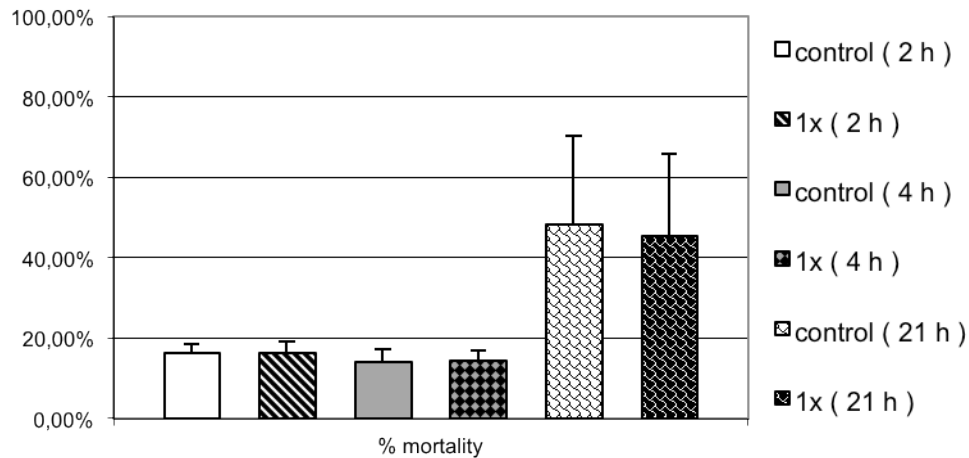


Fig. 1b

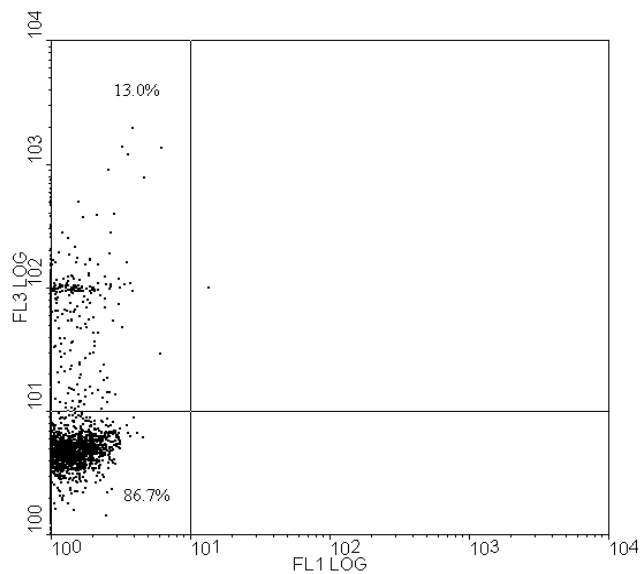


Fig. 1c

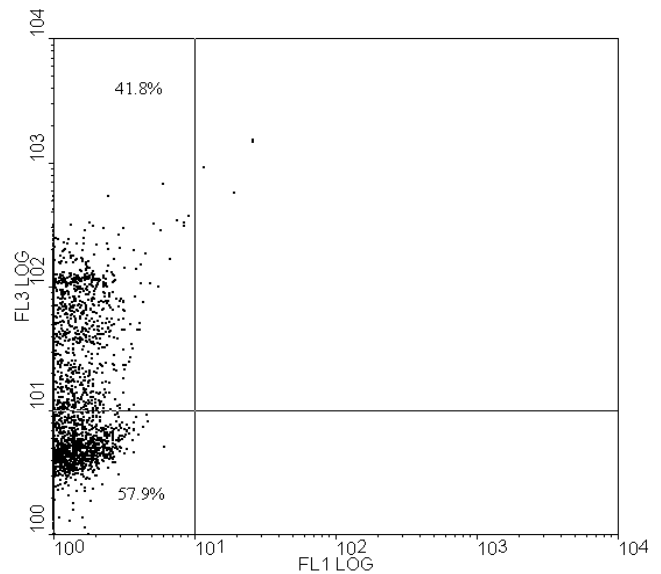


Figure 2. Hemocyte activities tested after exposure to the pesticides mixture at 1X concentration for Family n° 11. (a) Percentage of intracytoplasmic calcium positive cells after 2h and 4h exposure. (b) Flow cytometry cytogram of cells stained with Fluo-4 AM after a 4h incubation period. Horizontal-axis: intensity of fluorescence; Vertical-axis: number of cells; (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells. (c) Percentage of lysosomes positive cells after 2h and 4h exposure periods. (d) Flow cytometry cytogram of cells stained with Lysotracker Green DND-26 after a 4h incubation period. Horizontal-axis: intensity of fluorescence; Vertical-axis: number of cells; (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells. (e) Percentage of positive cells for phagocytic activity after 2h and 4h exposure periods

Figure 2

Fig. 2a

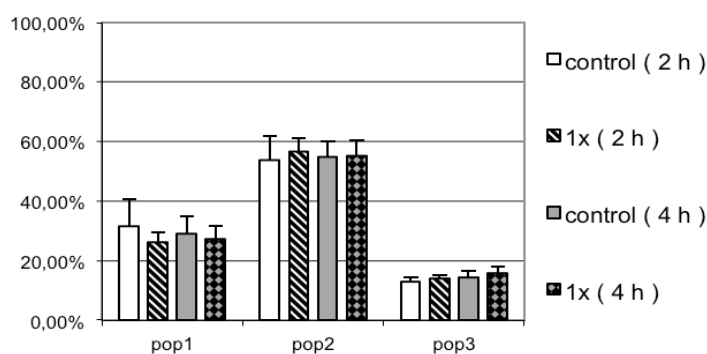


Fig. 2b

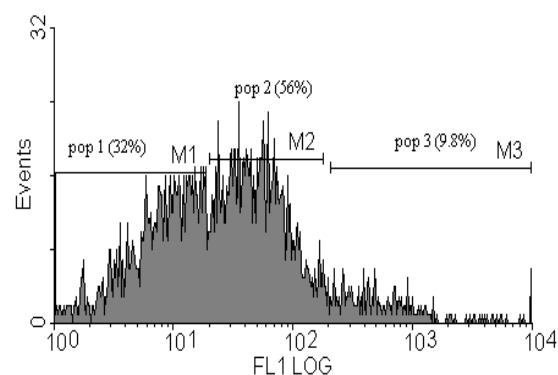


Fig. 2c

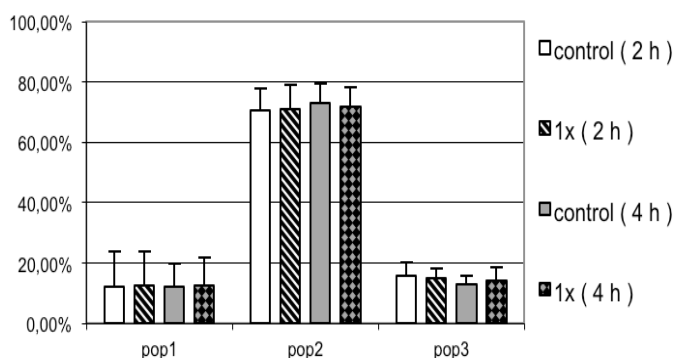


Fig. 2d

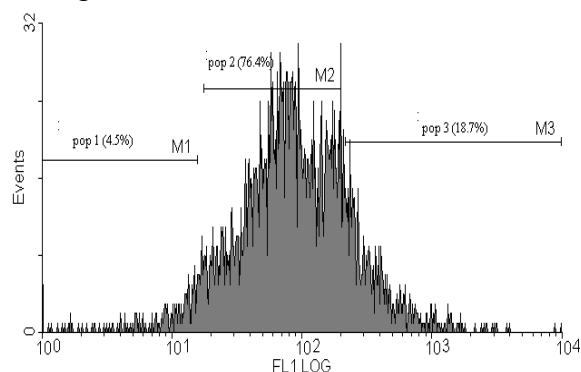


Fig. 2e

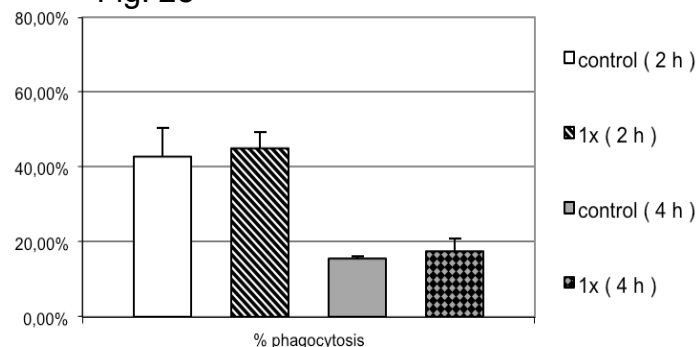


Figure 3. Hemocyte activities after exposure to the pesticide mixture at 1X concentration for Family n° 29. (a) Hemocyte mortality percentage after a 4h exposure period. (b) Percentage of intracytoplasmic calcium positive cells after a 4h exposure period. (c) Percentage of lysosomes positive cells after a 4h exposure period. (d) Percentage of phagocytic activity positive cells after a 4h exposure period

Figure 3

Fig. 3a

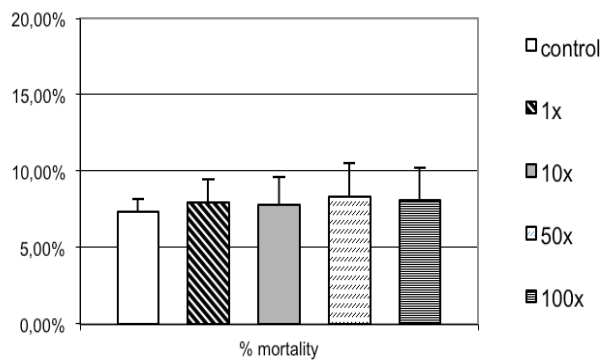


Fig. 3b

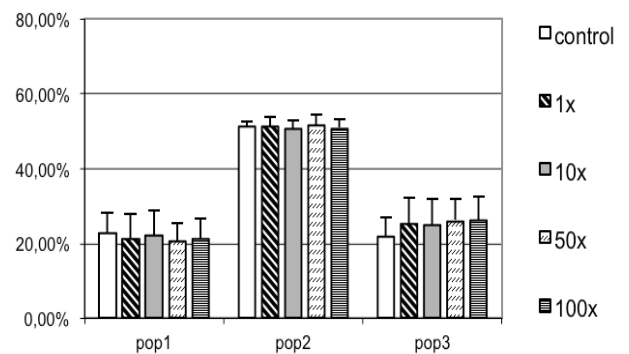


Fig. 3c

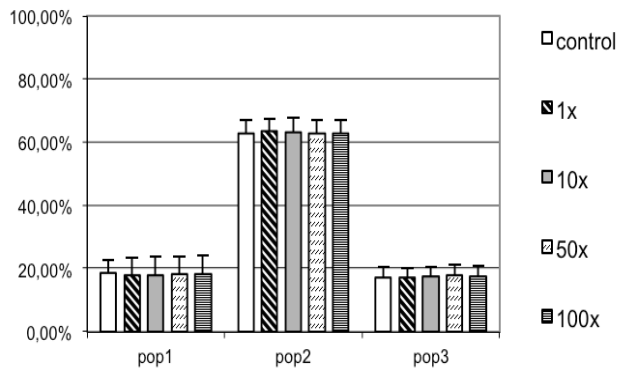


Fig. 3d

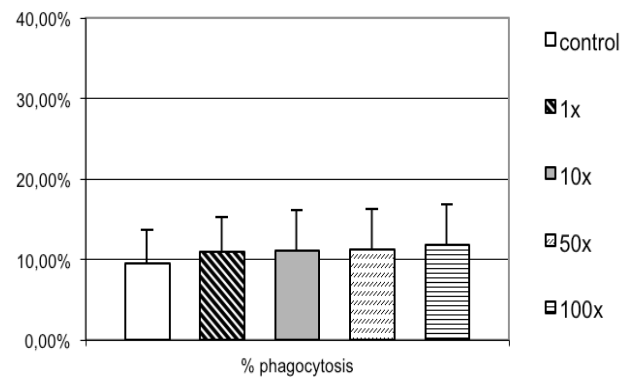


Figure 4. Hemocyte activities after exposure to metaldehyde alone for Family n° 29. (a) Hemocyte mortality percentage after a 4h exposure period at 100mg/L and 1g/L, and after exposure to a 6.5‰ salinity. (b) Flow cytometry cytogram demonstrating cells mortality percentages after a 4h exposure period to a salinity at 6.5‰

Figure 4

Fig. 4a

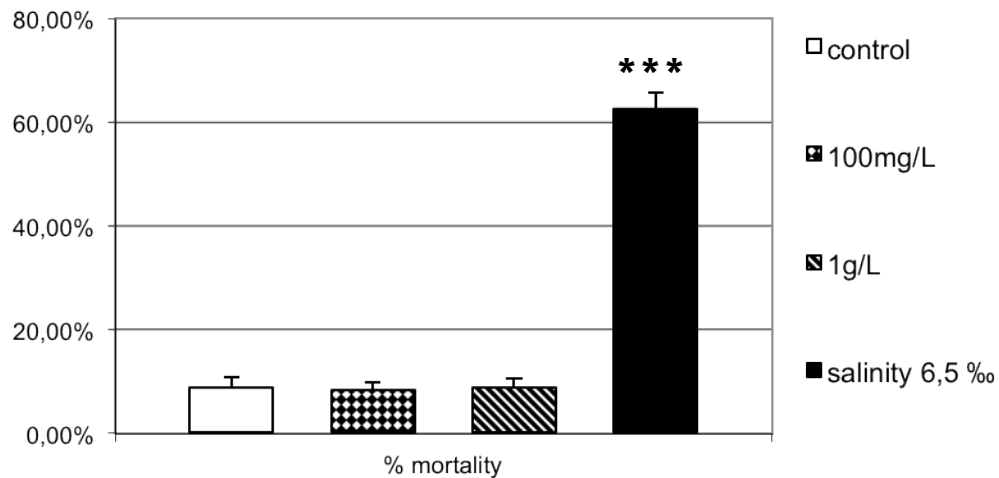


Fig. 4b

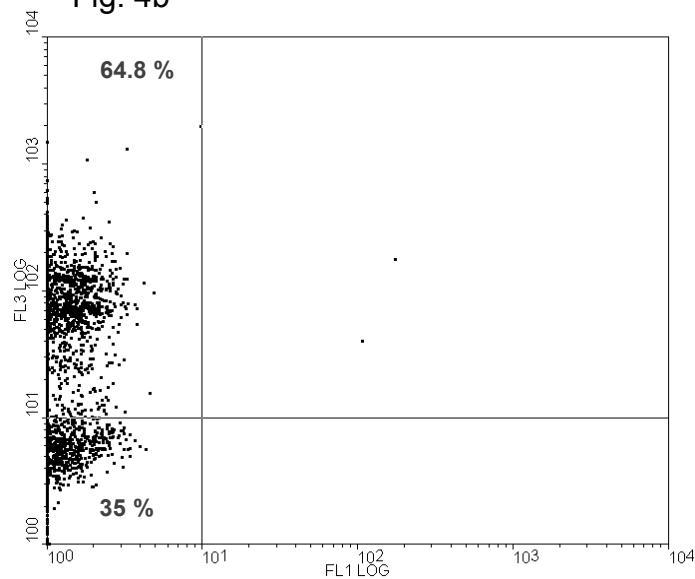


Figure 5. Hemocyte activities after exposure to metaldehyde alone for Family n° 29. (a) Percentage of non-specific esterase positive cells after a 4h exposure period at 100mg/L and 1g/L, and after exposure at 6.5‰ salinity. (b) Flow cytometry cytogram of cells stained with FDA at 100mg/L of metaldehyde (4h condition). Horizontal-axis: intensity of fluorescence for non-specific esterase activities; Vertical-axis: number of cells; (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells. (c) Flow cytometry cytogram of cells stained with FDA after exposure to at 6.5‰ salinity (4h condition). Horizontal-axis: intensity of fluorescence for non-specific esterase activities; Vertical-axis: number of cells: (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells

Figure 5

Fig. 5a

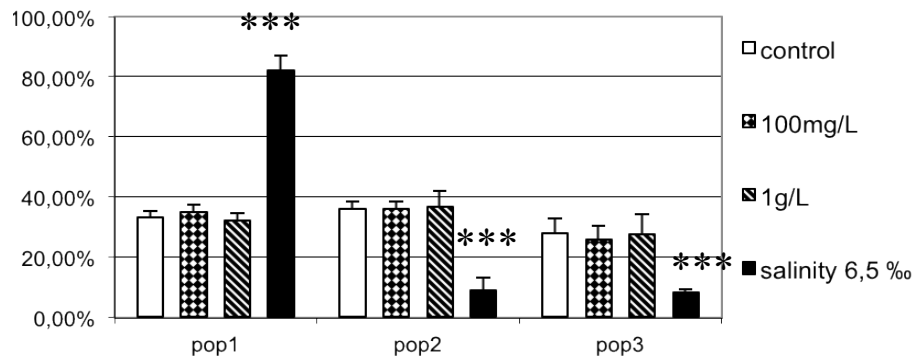


Fig. 5b

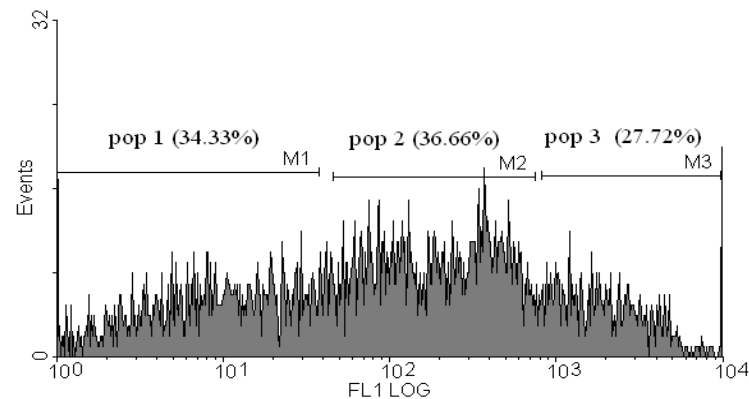


Fig. 5c

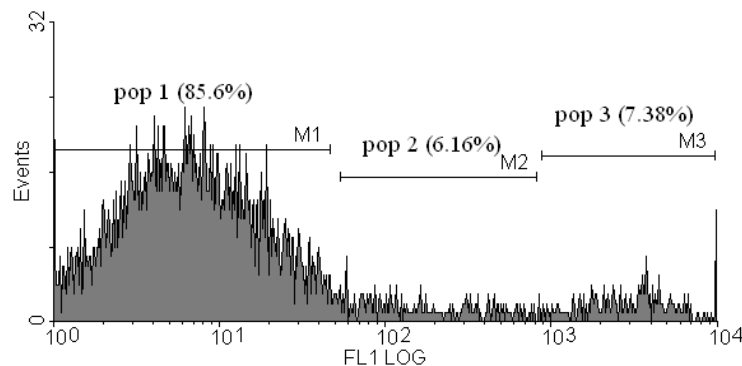


Table 1. Final concentrations of the pesticide mixture in presence of hemocytes and the solvents used

Table 1

Pesticides (solvent)	Concentration µg/L (1x)	Concentration µg/L (10x)	Concentration µg/L (50x)	Concentration µg/L (100x)
Carbaryl (CH)	0.05	0.5	2.5	5
Fosetyl Al	0.6	6	30	60
Alachlor (MeOH)	0.8	8	40	80
Métolachlor (AN)	1	10	50	100
Glyphosate	4	40	200	400
Atrazine (MeTE)	0.1	1	5	10
Terbutylazine	0.6	6	30	60
Diuron	2	20	100	200
AMPA	2.5	25	125	250
Bentazon	0.5	5	25	50
Tebuconazol	3	30	150	300
Imidacloprid (AN)	0.1	1	5	10
Mancozeb	0.1	1	5	10
Metaldehyde	0.1	1	5	10

Solvents: CH. cyclohexane; MeOH. methanol; AN. acetonitrile; MeTE. methyl terbutyl ether

Conclusion et discussion

Dans cette étude, les effets des pesticides ont été étudiés en utilisant un mélange de 14 molécules différentes afin de mieux représenter les milieux aquatiques dans lesquelles une grande variété de substances peut être simultanément détectée (Gagnaire *et al.*, 2006a ; Renault, 2011) y compris les herbicides et leurs métabolites (Lanyi & Dinya, 2003 ; Sorensen *et al.*, 2003 ; Vargha *et al.*, 2005). En revanche, le métaldéhyde a été testé individuellement, car cette substance (molluscicide) connue pour être toxique chez les gastéropodes terrestres (Dai *et al.*, 2011), a le potentiel pour être fortement toxique pour les huîtres comparé à d'autres pesticides.

La surveillance des paramètres hémocytaires peut être compromise par une forte variabilité inter-individuelle (Ordás *et al.*, 2000 ; Ford & Paillard, 2007). Afin de répondre à cette question et de minimiser les effets liés à la diversité génétique, les animaux appartenant à trois familles bi-parentales produites en écloserie plutôt que des huîtres collectées sur le terrain ont été utilisés comme matériel biologique.

Dans le milieu aquatique naturel, les concentrations maximales sont observables pendant de courtes périodes de temps et la majorité des herbicides sont peu bioaccumulables (Munaron, 2006 ; Hyne & Aistrophe, 2008). C'est pour cette raison qu'il a été choisi de réaliser des expositions de courtes durées lors des essais *in vitro* réalisées dans la présente étude.

Dans ce travail, la comparaison de trois familles bi-parentales suivant les activités hémocytaires et la mortalité des hémocytes des huîtres montre qu'elles n'ont pas été affectées par les pesticides lors d'une exposition de courte durée, *in vitro*. Cependant, une faible salinité (6,5 ‰) a eu un effet mesurable sur les hémocytes et les activités hémocytaires testées. Ceci a confirmé la validité des protocoles utilisés. L'exposition à court terme des hémocytes à différentes concentrations de pesticides n'a eu aucun effet significatif sur les paramètres évalués, ce qui suggère que ces cellules ont un certain niveau de résistance à l'égard des pesticides *in vitro*, dans les conditions testées. Ces observations sont cohérentes avec de précédents travaux, montrant un effet d'un mélange de pesticides sur la phagocytose à des concentrations élevées, supérieures à celles testées dans les travaux réalisés au cours de cette thèse (Gagnaire *et al.*, 2006a). Une autre étude a montré que seules des conditions de température et de salinité extrêmes ont un impact sur les hémocytes d'huître creuse maintenues *in vitro* (Gagnaire *et al.*, 2006b).

L'absence d'effets notables du mélange de pesticides sur les hémycytes pourrait s'expliquer en partie par des effets antagonistes entre certaines de ces substances, similaires à ceux rapportés pour le diuron et ses métabolites (Knauert *et al.*, 2008 ; Pesce *et al.*, 2010 ; Neuwoehner *et al.*, 2010). Elle pourrait également être liée aux paramètres choisis pour évaluer les activités des hémycytes comme la mortalité cellulaire, les activités estérase non spécifiques et l'activité phagocytaire. Toutefois, des études antérieures ont montré une modulation de ces paramètres, notamment de la phagocytose (Alvarez et Friedl, 1992 ; Larson *et al.*, 1989 ; Canty *et al.*, 2007). Des effets ont été rapportés sur des paramètres hémycytaires dans des tests réalisés *in vivo* chez l'huître creuse (Gagnaire *et al.*, 2007).

En conclusion, il apparaît utile de réaliser des expériences *in vivo* afin d'étudier les effets de l'exposition à court terme à des mélanges de pesticides et de définir des modèles de modulation immunitaire. La recherche d'autres paramètres pertinents pour caractériser les modifications rapides (Le Foll *et al.*, 2010) liées à l'adaptation physiologique des hémycytes *in vitro* constitue une voie de développement d'étude des mécanismes hémycytaires.

Article 2 : “In vivo effects of metaldehyde on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: comparing hemocyte parameters in two oyster families”

La présence de pesticides dans l'eau représente un risque environnemental pour l'huître creuse, *C. gigas*, déjà documenté au travers de travaux antérieurs (Rostagno *et al.*, 1999 ; Gagnaire *et al.*, 2003 ; Tanguy *et al.*, 2005 ; Gagnaire *et al.*, 2007). Cependant, l'action du métaldéhyde n'a pas été étudiée à ce jour chez cette espèce de bivalve. En effet, au regard des cibles (escargots et limaces) et du mode d'action de cette molécule, elle semblait potentiellement plus toxique pour l'huître creuse que d'autres pesticides (herbicides ou fongicides). Les effets du métaldéhyde sur les hémocytes d'huîtres creuses, appartenant à de deux familles ont été étudiés *in vivo*.

Les expérimentations ont consisté à étudier l'effet du métaldéhyde *in vivo* sur les hémocytes en suivant différents paramètres cellulaires en cytométrie en flux : la taille et la complexité, la mortalité cellulaire, la présence d'estérases non spécifiques et l'activité de phagocytose. La concentration de métaldéhyde de 0.1 µg/L correspond à une concentration moyenne détectée dans l'environnement. Le contact des huîtres avec le métaldéhyde a été de 24h. La température dans les bacs a été maintenue à 20°C. Les temps de prélèvement d'hémolymphe pour les analyses en cytométrie en flux ont été de 24h, 48h et 72h après contamination par le polluant. Pour cela, un pool d'hémolymphe collectés à partir de cinq animaux a été préparé pour chaque bac expérimental et pour chaque temps de prélèvement. L'hémolymphe a été prélevée dans le sinus hémolympatique du muscle adducteur et filtrée sur une maille de 60 µm. Les hémocytes ont été conservés sur glace. Les huîtres utilisées lors de ces expériences avaient la même origine (deux familles bi-parentales produites dans les installations Ifremer, La Tremblade : famille n°29 et famille n°32).

La taille et la complexité des hémocytes ont été mesurées avec 200 µL d'hémolymphe uniquement incubés 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Pour mesurer la mortalité hémocytaire, 200 µL d'hémolymphe ont été incubés avec 10 µL d'iodure de propidium pendant 30 minutes sur glace à l'obscurité. Les activités estérases non spécifiques ont été recherchées dans 200 µL d'hémolymphe après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante avec 1 µL de FDA. Enfin, l'activité de phagocytose a été suivie dans 200

µL d'hémolymph additionnés de 10 µL de billes fluorescentes de 1 µm de diamètre (ratio billes/hémocytes : 700/1) avec une incubation de deux heures à l'obscurité à température ambiante.

Des huîtres appartenant à deux familles bi-parentales (Famille n°29 et famille n°32) produites dans les mêmes conditions ont été utilisées dans la présente étude afin d'explorer la relation entre génétique et sensibilité aux polluants.

Les résultats montrent que le métaldéhyde à 0.1 µg/L (concentration moyenne détectée dans l'environnement), module certaines activités hémoctaires des huîtres après un contact de 24 heures en conditions, *in vivo*. Les animaux appartenant à deux familles ont montré des comportements différents après la contamination par le métaldéhyde.

Pour la Famille n° 32 (peu de mortalité lors d'une infection expérimentale), des différences significatives sont observées entre la condition « témoin » et la condition « métaldéhyde à 1X ». Pour la mortalité hémoctaire, il n'y a pas de différences significatives à 24h entre les traitements. Au temps 48h, la mortalité est significativement plus élevée en présence de métaldéhyde (1X). Pour les autres activités testées, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions « témoin » et « métaldéhyde 1X ».

Concernant la Famille n° 29 (forte mortalité suite à l'injection d'une suspension virale), des différences significatives ont également été observées entre la condition « témoin » et la condition « métaldéhyde ». Cependant, la réponse des activités hémoctaires diffère des observations obtenues pour les individus appartenant à la Famille n° 32. Aucune différence significative pour la mortalité hémoctaire n'a été rapportée pour tous les temps de prélèvement. Pour la taille et la complexité, la population cellulaire interprétée comme celle des granulocytes présente des différences significatives entre « témoin » et « métaldéhyde », avec une diminution de cette population en présence de métaldéhyde aux temps 24h et 48h. Au temps 72h, il n'y a plus de différences entre les deux conditions. Concernant les activités estérases non spécifiques, seule une différence significative est observée entre les deux conditions à 72h, avec une baisse significative de la population d'hémocytes présentant des activités estérases non spécifiques moyennes. Enfin, une différence significative ($p < 0.01$) a été observée pour l'activité de phagocytose entre les deux conditions, avec une baisse de cette activité en présence de

métaldéhyde au temps 24h à une concentration retrouvée dans l'environnement. Cette baisse pourrait être expliquée par une diminution de granulocytes après 24 heures, les granulocytes étant des cellules à fortes capacités phagocytaires. Il n'y a plus de différences du pourcentage de phagocytose pour les deux autres temps (48h et 72h).

Ces résultats suggèrent que les effets des polluants sur les huîtres peuvent différer d'une famille à une autre.

**Environmental Science and Pollution
Research**

Archimer

<http://archimer.ifremer.fr>

Article in Press

Acceptation date : May 2014

<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3162-7>

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

The original publication is available at <http://www.springerlink.com>

***In vivo* effects of metaldehyde on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*:
comparing hemocyte parameters in two oyster families**

Pierrick Moreau¹, Thierry Burgeot² and Tristan Renault^{1*}

¹ Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Ronce les Bains, 17390 La Tremblade, France

² Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Research Unit of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

*Corresponding author: Tristan Renault, email address : tristan.renault@ifremer.fr

Abstract:

Pollutants via run-off into the ocean represent a potential threat to marine organisms, especially bivalves such as oysters living in coastal environments. These organisms filter large volumes of seawater and may accumulate contaminants within their tissues. Pesticides contamination in water could have a direct or indirect toxic action on tissues or cells and could induce alteration of immune system. Bivalve immunity is mainly supported by hemocytes and participate directly by phagocytosis to eliminate pathogens. Some studies have shown that pesticides can reduce immune defenses and/or modify genomes in vertebrates and invertebrates. Metaldehyde is used to kill slugs, snails and other terrestrial gastropods. Although metaldehyde has been detected in surface waters, its effects on marine bivalves including the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, have never been studied. Given the mode of action of this molecule and its targets (molluscs), it could be potentially more toxic to oysters than other pesticides (herbicides, fungicides, insecticides, etc.). Effects of metaldehyde on oyster hemocyte parameters were thus monitored through *in vivo* experiments based on a short term exposure. In this work, metaldehyde at 0.1 µg/L which corresponds to an average concentration detected in the environment, modulated hemocyte activities of Pacific oysters after an *in vivo* short term contact. Individuals belonging to two families showed different behaviors for some hemocyte activities after contamination by metaldehyde. These results suggested that effects of pollutants on oysters may differ from an individual to another in relation to genetic diversity. Finally, it appears essential to take an interest in the effects of metaldehyde on a wide variety of aquatic invertebrates including those that have a significant economic impact.

Key Words: immunity, hemocytes, metaldehyde, Pacific oyster, flow cytometry, *in vivo*, genetic diversity.

Introduction

Coastal areas represent constantly changing environments and often are populated by abundant living communities. The relationship between river flow, inputs of organic matter and nutrients and estuarine primary production are well known. The importance of pollution of these areas by various toxic compounds has been proved (His *et al.*, 1999; Jacquet *et al.*, 2012). France is one of the first European users of pesticides for agriculture purposes and many of these molecules are found in the French coastal waters. Among the different pesticides found (herbicides, fongicides, insecticides, etc.) during detection campaigns, molluscicides including metaldehyde were also detected in surface waters (Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes - bilan 2010 du réseau Corpep, 2011). Metaldehyde (2,4,6,8-tetramethyl-1,3,5,7-tetraoxocanemetacetaldehyde) is an organic compound with the formula $(CH_3CHO)_4$. Metaldehyde is used to kill slugs, snails and other terrestrial gastropods. It acts on the mucocytes of the salivary and epidermis glands. It induces lesions of cell membranes and irreversible damages of mitochondria and nuclei (Nielsen, 1988). These actions make it impossible for the gastropods to rehydrate themselves. Soon as ingestion or contact with metaldehyde, the animal stops feeding. Death occurs in 6 hours in dry conditions and 24 hours in wet conditions (Nielsen, 1988). Metaldehyde treatment used in slug and snail control in agricultural crops acts by causing irreversible damage to mucous cells of the skin and gut lining, leading to excessive mucus production, destruction of the mucous cells, damage to the absorptive cells of hepatopancreas and ultimately to death (Triebkorn *et al.*, 1996). Although metaldehyde is forbidden in biological farming since 2006, it could be detected at concentrations of about 0.1 µg/L in 2010 and 2011 in the aquatic environment (Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes - bilan 2010 du réseau Corpep, 2011). Zhang *et al.* (2011) reported the half-life of metaldehyde in soil was about 4 days, but there is no data about half-life in the water.

While there are many examples of relationships which can exist between pollution and increased susceptibility to infectious diseases in mammals and vertebrates, few work

has been done in invertebrates (Gagnaire *et al.*, 2007). Mass mortality outbreaks of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spat observed since 2008 in France related to ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection (Segarra *et al.*, 2010) can leave suspect the quality of the marine environment (Renault, 2011) and a role of pesticides with a seasonal use and the arrival of fresh waters in the estuarine areas during spring (Burgeot *et al.*, 2008). In this context, the Pacific oyster appears as a species of interest to define the importance of the immune system as a target of pollutants in invertebrates and mainly molluscicides in bivalves. Although metaldehyde has been detected in surface waters and is known to be toxic for terrestrial and aquatic gastropods including snails (Dai *et al.* 2011), its effects on marine bivalves including the Pacific oyster, *C. gigas*, have never been studied. Oysters as marine mollusc could be exposed after application in a cultural or a domestic area. Metaldehyde is mainly known for food poisoning in mammals. Dogs, cattle, horses and wild lagomorphs are the species most often poisoned by metaldehyde (Campbell. 2008; Mills. 2008; Bates *et al.*, 2012; Tawde *et al.*, 2012).

Effects of metaldehyde on oyster hemocyte parameters were thus monitored through *in vivo* experiments based on a short term exposure. Pacific oyster were incubated with metaldehyde for a 24h period and hemolymphs were collected from the adductor muscle sinus after contamination. Oysters belonging to two bi-parental families produced in the same conditions were used in the present study in order to explore relationship between genetics and pollutant susceptibility. In order to reveal potential effects of metaldehyde, hemocyte parameters including dead/alive cells, non-specific esterase activities, and phagocytosis were monitored by flow cytometry. The purpose of this work relied on providing answers at two questions: (1) can metaldehyde at an environmental concentration affect hemocyte viability and activities in the Pacific oyster after a short exposure? (2) could it be possible to show a relationship between susceptibility to the pollutant and oyster genetic diversity ?

Materials and methods

Pacific oysters

Within the framework of the European project Bivalife (FP7, 2011-2014), bi-parental families of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were produced at Ifremer's facilities (La Tremblade, Charente Maritime, France) in order to obtain biological material presenting contrasted susceptibility to different pathogens including OsHV-1. Two of the bi-parental families were selected on the basis of their susceptibility to the viral infection (OsHV-1) in experimental conditions. Family 32 presented moderate mortality rates (around 30%) and family 29 presented high mortality rates (around 86%) 5 days after experimental OsHV-1 infection. These families have been previously used to explore pesticide susceptibility of *C. gigas* hemocytes (Moreau *et al.*, 2014). For both families animals were 11 month old at the time of experiments.

Metaldehyde

Metaldehyde was purchased from Supelco (Sigma-Aldrich). Solvent (methanol) was used as recommended by the manufacturer and its concentration was less than 0.5 % in order to avoid disturbance of hemocyte parameters.

Experimental design

Assays were carried out to study the effects of metaldehyde *in vivo* on Pacific oysters belonging to families 32 and 29, following different hemocyte parameters by flow cytometry: cell size and complexity, hemocyte mortality, non-specific esterase activities and phagocytic activity. Concentrations tested (0.1 µg/L or 1X) corresponded to an average concentration reported in the aquatic environment.

Pacific oysters were incubated with metaldehyde during 24h. The water containing the pollutant in absence of algae was removed from the tanks after a 24h period incubation. After the 24h contact with the pollutant, oysters were maintained in absence of metaldehyde for 48 hours in order to collect samples at different time points. Oysters were fed with *Chaetoceros gracialis* (3×10^9 cells per tank). Water was changed at Day

1 (24h), day 2 (48h) and day 3 (72h). Temperature of seawater in tanks was maintained between 19.5°C and 20°C during the experiment. Hemolymphs were collected at 24h, 48h and 72h. Four tanks were used in these experiments: 2 tanks with metaldehyde treatment and 2 tanks without metaldehyde treatment receiving the same quantity of solvent used for testing metaldehyde (the solvent was added in the water: negative controls). A pool of filtered hemolymphs was prepared for each tank from 5 oysters at each time of collection (24h, 48h and 72h). The experiment was repeated three times for both families.

Hemocyte collection

Pacific oyster hemolymph was withdrawn from the adductor muscle sinus, with the use of 1ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25mm) after breaching the shell using pincer. Hemolymph samples were filtered on a 60 µm mesh to eliminate debris. Hemocytes were counted using a Malassez cell. Cells from 5 oysters per tank (2 tanks with metaldehyde treatment and 2 tanks without metaldehyde treatment) were pooled in order to manage inter-individual variations and to provide enough hemocytes to carry out experiments. Hemocytes were kept on ice until use to avoid cell aggregation.

Flow cytometry

Oyster hemocyte activities were monitored using flow cytometry (EPICS® XL flow cytometer, Beckman Coulter) and counting 5 000 events. Cell cytograms showed cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used. A gate was defined on the basis of FSC value in order to eliminate cell debris. To measure hemocyte mortality, 200 µL of hemolymph were incubated with 10 µL of propidium iodide for 30 min on ice in the dark (Gagnaire *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2014). Non-specific esterase activities were investigated in 200 µL of hemolymph after 30 min incubation in the dark at room temperature with 1 µL of FDA (fluorescein diacetate) (Gagnaire *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2014). Lastly, the phagocytic activity was followed in 200 µL of hemolymph supplemented with 10 µL of fluorescent beads 1 µm in diameter (ratio bead / hemocyte: 700/1) with a 2 hour incubation in the dark at room temperature. Cell size and complexity were measured in

200 µL of hemolymph incubated for 30 min in the dark at room temperature without any treatment (Gagnaire *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2014).

Statistical analysis

Results were expressed as percentage of labelled cells. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon - Mann Whitney test by statistical software R, to compare two groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare more than two groups. Significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**).

Results

A preliminary experiment was carried out using two concentrations of metaldehyde (0,1 µg/L (1x) and 1 µg/L (10x)). Similar results were reported for both tested concentrations (data not shown). The lowest concentration was selected in the present study in order to represent the average concentration found in the environment (mainly surface water and groundwater).

For the family 32, significant differences were observed between negative controls and metaldehyde treatment for hemocyte mortality. Although no significant difference was reported between treatments at 24h, at 48h cell mortality was significantly higher in presence of metaldehyde: $8.04\% \pm 0.48\%$ for negative control and $10.87\% \pm 0.34\%$ for metaldehyde treatment (Figure 1c). At 72h, cell mortality was also higher in presence of metaldehyde: $8.68\% \pm 0.50\%$ for negative control and $11.23\% \pm 0.65\%$ for metaldehyde treatment (Figure 1c). For other activities tested, no significant differences were observed between both conditions (Figures 1a, 1b and 1d). For this family, the presence of metaldehyde at environmental concentration significantly increased hemocyte mortality at 48 hours ($p < 0.01$) and 72 hours ($p < 0.05$) after an exposure of 24 hours (Figure 1c).

Concerning the family 29, significant differences were observed between negative controls and metaldehyde treatment for hemocyte parameters. Although no significant

differences in hemocyte mortality were observed for all sampling times (Figure 2c), differences were reported for cell size and complexity between negative controls and metaldehyde treatment, with a significant decrease of population 3 (interpreted as granulocytes) in the presence of metaldehyde at 24h and 48h (Figure 2a). At 72h, there was no more difference between both conditions. Regarding the non-specific esterase activities, a significant difference between negative controls and metaldehyde treatment was reported at 72 hours, with a significant reduction of the population presenting an intermediate level of non-specific esterase activities in presence of metaldehyde (Figure 2b). Finally, a significant difference ($p < 0.01$) was observed for the phagocytic activity between both conditions, with a decrease of the activity in the presence of metaldehyde at 24 hours (Figure 2d). There was no difference at 48h and 72h (Figure 2d).

Discussion

Metaldehyde at 0.1 µg/L which corresponds to an average concentration detected in the aquatic environment modulated hemocyte activities of Pacific oysters after an *in vivo* short term contact. Previous studies showed that hemocytes could have some level of resistance towards pesticides at high concentration *in vitro* (Gagnaire *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2014). In the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, reduced phagocytosis activity was observed after exposure to triforine (Alvarez and Friedl. 1992) and to the insecticide Chlordan at 250 µM *in vitro* (Larson *et al.* 1989). Canty *et al.* (2007) reported a decrease in phagocytic index in the blue mussel, *Mytilus edulis*, after a short exposure to 0.1 mg/L azamethipos. Gagnaire *et al.* (2003) demonstrated also effects of pesticides on hemocytes of Pacific oysters for high concentrations. Moreover, metaldehyde at high concentrations showed no effects on *C. gigas* hemocytes in *in vitro* assays (Moreau *et al.*, 2014). At a concentration of 1 g/L, metaldehyde did not affect Pacific hemocytes maintained *in vitro* (Moreau *et al.*, 2014), whereas effects were reported in the present study at a concentration of 0.1 µg/L. To understand possible adverse effects of pollutants, it appears most suited to develop *in vivo* assays as such assays integrate physiological processes than to use *in vitro* assays.

Individuals belonging to two families showed different behaviors for some hemocyte activities after contamination by metaldehyde. The increase of hemocyte mortality at 48h ($p < 0.01$) and 72h ($p < 0.05$) for the family 32, suggested a direct role of metaldehyde killing hemocytes in this family. A direct toxicity of metaldehyde on cells was not observed for family 29. These observations suggested that metaldehyde could induce a decrease of the number of circulating immuno-competent cells, in family 32 and could reduce thus immune defenses through direct killing of hemocytes. It appears that Pacific oysters depending on their genetic diversity may present some differences in terms of susceptibility to metaldehyde as no increase of dead cells was reported for the family 29 in similar conditions. Concerning other hemocyte parameters (size and complexity, non-specific esterase activities and phagocytosis) metaldehyde demonstrated any effect on hemocytes of family 32. For family 29, metaldehyde had no direct effect on hemocyte mortality. However, other parameters were modulated by the presence of metaldehyde at 0.1 $\mu\text{g/L}$. The results suggested that metaldehyde could have inhibitory effects on non-specific esterase activities. About the size and complexity, at 24h ($p = 0.01$) and 48 hours ($p < 0.05$) a decrease of population 3 interpreted as granulocytes was observed in the presence of metaldehyde suggesting a negative effect on granulocytes after a short term exposure. Granulocytes are cells that possess high phagocytic capacity and the decrease of this population could be related to the decrease in phagocytic activity ($p < 0.01$) reported at 24 h. Metaldehyde treatment was thus associated with a decrease of phagocytic activity at 24h, whereas there were no longer effects at 48h and 72h, which suggested possible restoration of cellular functions either by acclimation and/or metabolization of metaldehyde. This type of transient effect face to stimulation in controlled conditions and recovery after some acclimatization time had already been observed in *Lymnaea stagnalis* for phagocytosis (Russo & Lagadic. 2004). Other molecules also have effects on phagocytosis. Cooper & Roch (2003) showed that *Eisenia fetida* phagocytosis was inhibited by carbaryl. In carp *Cyprinus carpio*, glyphosate has caused a decrease in phagocytic activity. Organochlorine pesticides such as DDT and lindane caused effects on the immune response in vertebrates by reducing phagocytosis, antibody production and increased susceptibility to diseases (Snieszko 1974; Dunier, 1991, Wong *et al.*, 1992; Dunier &

Siwicki, 1993; Koner *et al.*, 1998; Blakley *et al.*, 1999). Phagocytosis can also be modulated in bivalves by dieldrin and chlordane (Anderson *et al.*, 1981. Larson *et al.*, 1989.). The effect of metaldehyde on phagocytic activity suggested that this molecule could act as an immunomodulator in the Pacific oysters rendering them more susceptible to infectious agents. Gagnaire *et al.* (2007) have demonstrated that the Pacific oysters were more susceptible to bacteria in the presence of pesticides. Oyster mortality was higher in pesticide-treated oysters compared to untreated ones after a bacterial challenge in experimental conditions. The expression of oyster genes was up-regulated in pesticide-treated oysters compared to untreated ones after the bacterial challenge (Gagnaire *et al.*, 2007).

Results from the present study suggest that the genetic variability of animals needs to be taken into account when it is desired to test the effects of metaldehyde. Susceptibility to pollutants in the Pacific oyster and / or other bivalve species can be different and this could be explained by genetic variability that can exist within the same species. For example, a study showed there is variation in susceptibility to metaflumizone among 29 field populations of *Plutella xylostella* collected from 14 geographical locations in China (Khakame *et al.*, 2013). Another study reported a comparison of two pre-adult groups of *Parascaris equorum* presenting different susceptibility to ivermectin and revealed difference in terms of SNPs detection and genes expression between groups of worms in presence of ivermectin (IVM). These results indicate that putatively resistance associated SNPs in populations with reduced IVM susceptibility could be identified. Recently, other studies have shown the relationship between genetic variability and sensitivity to pesticides. Uncovering SNP environment interactions can generate new hypotheses about the function of poorly characterized genetic variants and environmental factors, like pesticides (Koutros *et al.*, 2013). This study suggests known genetic susceptibility loci may modify the risk between pesticide use and prostate cancer (Koutros *et al.*, 2013).

The results of the present study showed that it is essential to take an interest in the effects of metaldehyde on a wide variety of non target aquatic organisms including

those that have a significant economic impact. Experiments are continuing to investigate the effects of mixed pesticides (including metaldehyde) found in the environment on OsHV-1 experimental infection by following hemocyte parameters by flow cytometry and expression of immune related genes in the Pacific oysters by real-time PCR. Luna-Acosta *et al.* (2012) showed an effect on the expression of immune-related genes of Pacific oysters in the presence of diuron alone or mixed to other pesticides. The presence of pesticides could have a negative effect on the immune system of Pacific oysters decreasing immune capabilities, and a possible increase in susceptibility towards various infectious agents, including OsHV-1 could be observed. Further studies are needed in order to define interactions between Pacific oysters, OsHV-1 and the pesticides most frequently detected in the environment. It is also conceivable that the pesticides act directly on the virus itself. This may bring some answers about the complex relationships that may exist between environmental conditions and massive mortality outbreak of Pacific oysters.

Acknowledgments

This work was partially funded through the EU project Bivalife (n° 266157) and the Poitou Charentes Region. The authors wish to thank the Ifremer hatchery team (LGPM) in La Tremblade and the nursery team (LSPC) in Bouin for the production of Pacific oysters.

References

- Anderson, R. S. (1981). Effects of carcinogenic and non-carcinogenic environmental pollutants on immunological functions in marine invertebrates. Phyletic approaches to cancer. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 319-331.
- Alvarez MR, Friedl FE. Effects of a fungicide on in vitro hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 1992 Oct 15;107(2-3):135-40.
- Bates NS, Sutton NM, Campbell A. Suspected metaldehyde slug bait poisoning in dogs: a retrospective analysis of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Vet Rec*. 2012 Sep 29;171(13):324.
- Bilan 2010 du réseau Corpep (2011) - Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes - Bretagne Environnement.
<http://www.bretagne-environnement.org/Media/Documentation/Bibliographies/Les-pesticides-dans-les-eaux-superficielles-bretonnes-bilan-2010-du-reseau-Corpep>
- Blakley B, Brousseau P, Fournier M, Voccia I. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and Industrial Health*. 1999 Feb 1;15(1-2):119-32.
- Burgeot T., Gagnaire B., Renault C., Haure J., Moraga D., David D., Boutet I., Sauriau P.G., Malet N., Bouchet V., Le Roux A., Lapègue S. Bouilly K., Le Moullac G., Arzul G., Knoery J., Bacher C., Soletchnik P. (2008). Oyster summer mortality risks associated with environmental stress. Chapter 3 in Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest project. Edited by J.F. Samain and H. Combie. Quae Editions. 107-153
- Campbell A. Metaldehyde poisoning of dogs. *Vet Rec*. 2008 Sep 13;163(11):343.
- Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, Cooper L, Galloway TS. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull*. 2007 Apr;54(4):396-402.
- Cheng TC. Bivalves. *Invertebrate blood cells*. 1981;(1):233-300.

- Coles JA, Pipe RK. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish & Shellfish Immunology. 1994 Sep;4(5):337–52.
- Cooper EL, Roch P. Earthworm immunity: a model of immune competence. Pedobiologia. 2003 Jan;47(5-6):676–88.
- Dai L, Wang W, Dong X, Hu R, Nan X. Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. Environ Toxicol Pharmacol. 2011 Sep;32(2):226–32.
- Dunier M, Siwicki AK, Demaël A. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 1991 Aug;22(1):79–87.
- Dunier M, Siwicki AK. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. Fish & Shellfish Immunology. 1993 Nov;3(6):423–38.
- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapegue S, Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. Curr Pharm Des. 2003;9(2):193–9.
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J-Y, Saulnier D, Renault T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquatic Toxicology. 2007;84(1):92–102.
- His E, Heyvang, Isabelle, Geffard Olivier, De Montaudouin Xavier. A COMPARISON BETWEEN OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) AND SEA URCHIN (*PARACENTROTUS LIVIDUS*) LARVAL BIOASSAYS FOR TOXICOLOGICAL STUDIES. 1999;
- Jacquet R, Miège C, Bados P, Schiavone S, Coquery M. Evaluating the polar organic chemical integrative sampler for the monitoring of beta-blockers and hormones in wastewater treatment plant effluents and receiving surface waters. Environ Toxicol Chem. 2012 Feb;31(2):279–88.

- Khakame SK, Wang X, Wu Y. Baseline toxicity of metaflumizone and lack of cross resistance between indoxacarb and metaflumizone in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J Econ Entomol. 2013 Jun;106(3):1423–9.
- Koner BC, Banerjee BD, Ray A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. Indian J Exp Biol. 1998 Apr;36(4):395–8.
- Koutros S, Berndt SI, Hughes Barry K, Andreotti G, Hoppin JA, Sandler DP, *et al.* Genetic susceptibility loci, pesticide exposure and prostate cancer risk. PLoS ONE. 2013;8(4):e58195.
- Larson KG, Roberson BS, Hetrick FM. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. Diseases of aquatic organisms. 1989;6(2):131–6.
- Luna-Acosta A, Renault T, Thomas-Guyon H, Faury N, Saulnier D, Budzinski H, *et al.* Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Chemosphere. 2012 Jun;87(11):1335–40.
- Mills NJ. Metaldehyde poisoning of dogs. Vet Rec. 2008 Sep 6;163(10):310.
- Moreau P, Burgeot T, Renault T. Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays. Environmental Science and Pollution Research. 2014 Apr;21(7):4940–9.
- Nielsen, James W. "Method and composition for killing terrestrial molluscs." U.S. Patent No. 4,765,979. 23 Aug. 1988.
- Renault T. Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know? In: Stoytcheva M, editor. Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits [Internet]. InTech; 2011 [cited 2014 May 19]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-risks-and-benefits/effects-of-pesticides-on-marine-bivalves-what-do-we-know-and-what-do-we-need-to-know->
- Russo J, Lagadic L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). Environ Pollut. 2004;127(2):303–11.

- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* 2010 Oct;153(1):92–9.
- Snieszko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology.* 1974 Mar;6(2):197–208.
- Tawde SN, Puschner B, Albin T, Stump S, Poppenga RH. Death by caffeine: presumptive malicious poisoning of a dog by incorporation in ground meat. *J Med Toxicol.* 2012 Dec;8(4):436–40.
- Triebkorn R, Henderson I,F, Martin A, Kolher HR. Slugs as target or non-target organisms for environmental chemicals. 1996 In: *Slugs and Snail Pests in Agriculture*, ed, Henderson, I.F. BCPC Monograph No 66: 65-72
- Wong, Steve, *et al.* "Environmental immunotoxicology." *Animal biomarkers as pollution indicators.* Springer Netherlands, 1992. 167-189.
- Zhang H, Wang C, Lu H, Guan W, Ma Y. Residues and dissipation dynamics of molluscicide metaldehyde in cabbage and soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2011 Sep;74(6):1653–8.

Figure legends

Figure 1. Hemocyte activities tested after oyster exposure to metaldehyde at 1X concentration for family 32. (a) Cell size and complexity: pop 1 corresponds to a population of cells presenting large size and low complexity, pop 2 a population of large and complex cells, pop 3 a population of small and complex cells (granulocyte). (b) Pourcentage of non-specific esterase activities; Vertical-axis: number of cells; (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells. (c) Hemocyte mortality percentage after oyster exposure to metaldehyde for 24 h. (d) Percentage of positive cells for phagocytic activity after oyster exposure to metaldehyde for 24 h

Figure 1

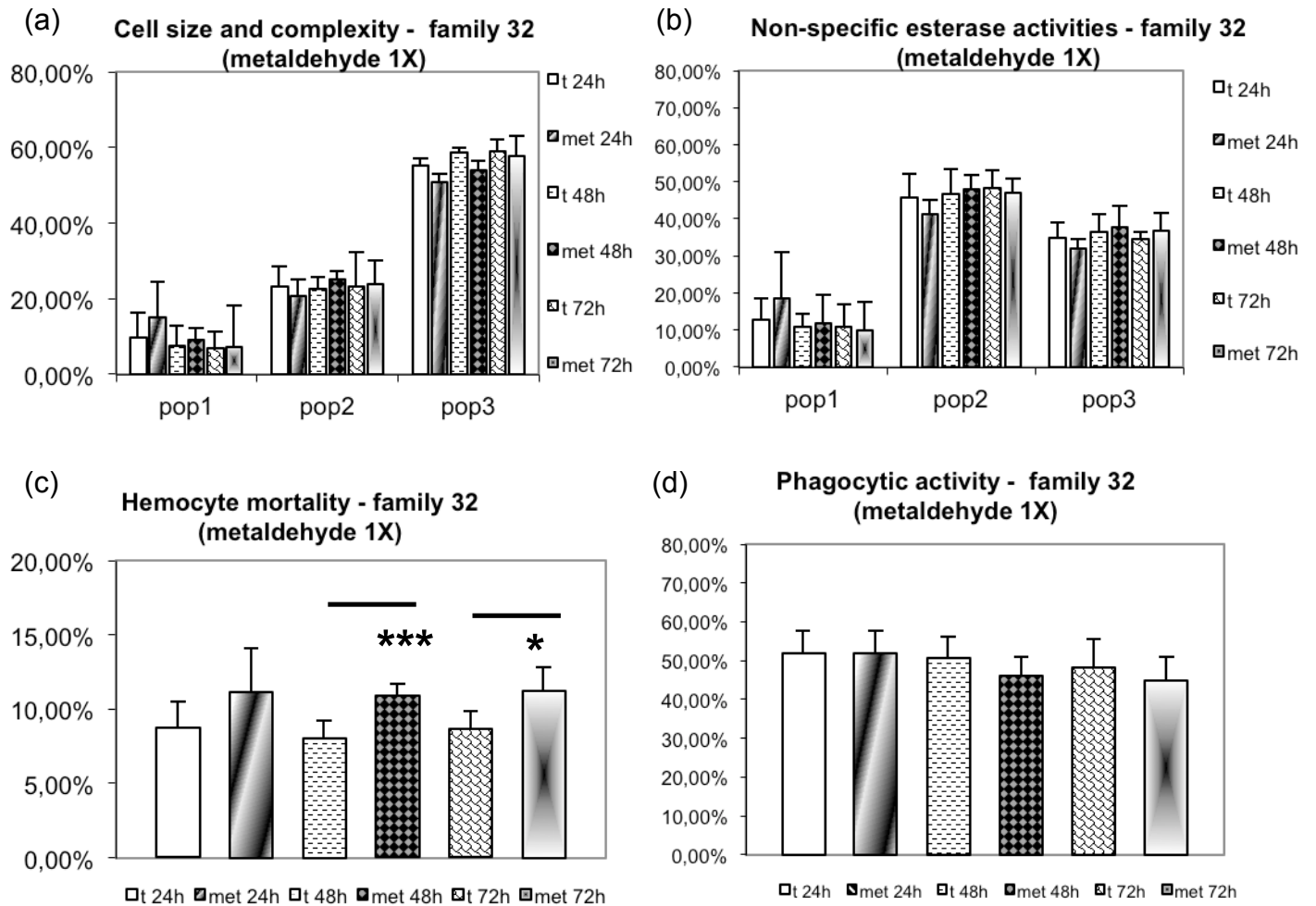
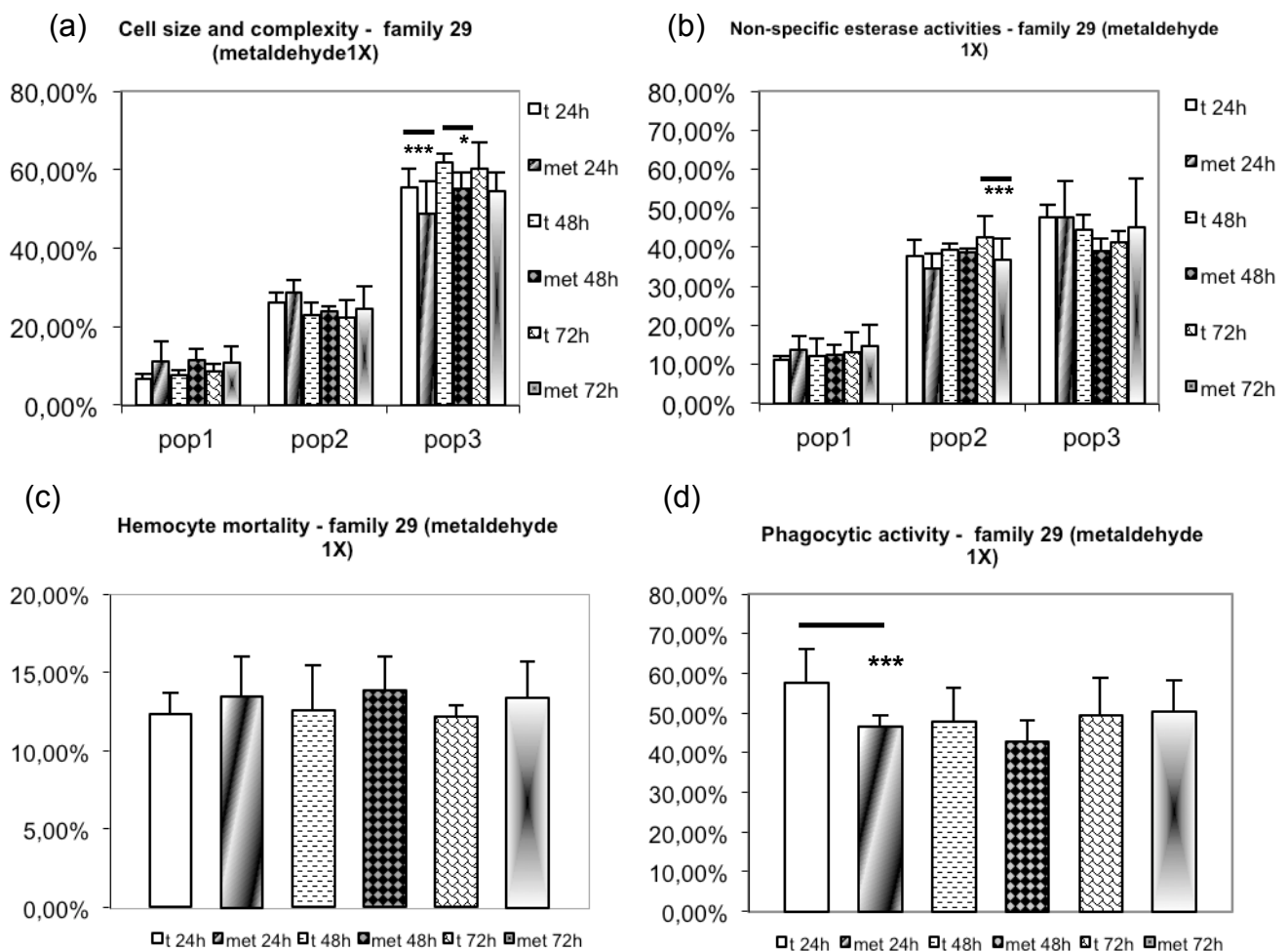


Figure 2. Hemocyte activities tested after oyster exposure to metaldehyde at 1X concentration for family 29. (a) Cell size and complexity: pop 1 corresponds to a population of cells presenting large size and low complexity, pop 2 a population of large and complex cells, pop 3 a population of small and ucomplex cells (granulocyte). (b) Pourcentage of non-specific esterase activities; Vertical-axis: number of cells; (pop 1) population considered as negative cells; (pop 2) population of moderately stained cells; (pop 3) population of strongly stained cells. (c) Hemocyte mortality percentage after oyster exposure to metaldehyde for 24 h. (d) Percentage of positive cells for phagocytic activity after oyster exposure to metaldehyde for 24 h.

Figure 2



Conclusion et discussion

Les résultats de cette étude montrent que les deux familles présentant des comportements différents lors d'une infection expérimentale par OsHV-1, ne répondent pas de la même façon concernant les différentes activités hémoctaires testées après une contamination par du métaldéhyde. La comparaison de familles ayant des caractères de résistance différents semble constituer une approche pertinente pour étudier les effets d'un pesticide.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux apportent deux informations importantes :

- ✓ La présence de métaldéhyde à concentration dite « environnementale » module certaines activités hémoctaires de l'huître creuse.
- ✓ Deux familles présentant des comportements différents lors d'une infection expérimentale par injection d'une suspension contenant le virus OsHV-1 (familles produites en même temps dans les mêmes conditions et ayant subi la même histoire) ont montré des comportements différents pour certaines des activités hémoctaires en présence de métaldéhyde (1X).

Les résultats de la présente étude ont montré que le métaldéhyde peut avoir des effets sur certaines activités des hémocytes d'huître creuse, qui sont les principales cellules actrices de l'immunité chez cette espèce. Ces observations suggèrent que ce pesticides serait capable de modifier les capacités de défense. Luna-Acosta et coll. (2012) ont montré un effet sur l'expression de gènes liés au système immunitaire chez l'huître creuse en présence de diuron seul ou mélangé à d'autres pesticides. Akcha et coll. (2012) ont montré des effets génotoxiques du diuron à 0,05 µg/L sur les spermatozoïdes d'huître creuse.

D'autres études sont nécessaires pour définir les interactions entre les huîtres, OsHV-1 et les pesticides les plus fréquemment détectés dans l'environnement. Il est également concevable que les pesticides agissent directement sur le virus lui-même. Cela peut apporter des réponses sur les relations complexes qui pourraient exister entre les conditions environnementales et les mortalités massives observées chez les huîtres.

Chapitre II:

**Effets des pesticides sur le virus
OsHV-1 et la sensibilité des huîtres à
l'infection virale**

La deuxième partie de la thèse a concerné l'étude des effets d'un mélange de pesticides sur le virus OsHV-1 lui-même et sur le développement de l'infection virale chez des huîtres après un contact avec les polluants.

Dans un premier temps, des suspensions virales (préparées à partir de tissus d'huîtres infectées broyées et filtrées) ont été mises au contact d'un mélange de 14 pesticides à différentes concentrations. Les effets sur le virus lui-même ont été analysés d'une part (*in vitro*), au travers de la quantification des capsides virales intègres par une technique de PCR en temps réel et l'utilisation de monoazide de propidium (PMA) (Renault *et al.*, com. personnelle). D'autre part, les effets des pesticides sur le pouvoir infectieux du virus ont été explorés *in vivo*. Pour cela, des animaux ont été infectés expérimentalement par injection d'une suspension virale ayant été au contact préalablement avec les pesticides. Ces approches ont ainsi permis de montrer que le mélange de pesticides à différentes concentrations n'avait pas d'incidence sur la stabilité du virus en suspension dans les conditions testées.. En effet, un contact préalable de la suspension virale avec le mélange de pesticides n'a pas été associé avec une augmentation du nombre de capsides dégradées ni avec une réduction des mortalités observées chez des huîtres injectées.

Une famille bi-parentale d'huître creuse, *C. gigas*, produite par l'Ifremer a été sélectionnée pour appréhender les effets des pesticides sur la sensibilité des animaux à l'infection à OsHV-1, après une contamination préalable avec le mélange de pesticides. Il s'agit d'une famille (F22) présentant 50% de mortalité lors d'une infection virale expérimentale. Il a en particulier été choisi une famille présentant une mortalité modérée afin de pouvoir appréhender un possible effet négatif de pesticides sur la survie des animaux expérimentalement infectés.

La sensibilité des animaux à l'infection virale après traitement avec le mélange de pesticides a été explorée par des essais de pathologie expérimentale en utilisant des protocoles existants (Schikorski *et al.*, 2011a ; Schikorski *et al.*, 2011b). Les résultats des travaux réalisés ont été rapportés sous forme d'un article (Article n°3). Ils montrent notamment une sensibilité accrue des huîtres injectées avec la suspension virale, lorsqu'elles ont été exposées préalablement aux pesticides. Il semblerait donc que ces polluants induisent des effets néfastes sur le système immunitaire de l'huître creuse.

Article 3 : “Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the Pacific oyster, Crassostrea gigas”

Les tests effectués ont consisté à étudier l'effet du mélange de pesticides *in vitro* à différentes concentrations (1X, 10X et 200X) sur des suspensions virales au cours d'une période de 24h. Les effets des pesticides sur l'intégrité des capsides virales ont été explorés par la technique de PCR PMA (propidium monoazide). Le monoazide de propidium est un colorant photo-réactif qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin. Il est utilisé pour détecter les micro-organismes viables par PCR en temps réel (Parshionikar *et al.*, 2010 ; Fittipaldi *et al.*, 2010 ; Bae & Wuertz 2012 ; Kim & Ko 2012 ; Renault *et al.*, comm personnelle). La lumière (Appareil Fast blue : lampes halogènes à haute puissance) induit une réaction photochimique qui conduit à une liaison covalente avec l'ADN double brin et le PMA. Cette fixation rend l'ADN non amplifiable par PCR. Dans notre étude, l'ADN viral contenu dans les capsides non intègres a pu se lier au PMA et n'était alors plus amplifiable. Les capsides intègres n'ont par contre pas permis au PMA de pénétrer et de se lier de manière covalente à l'ADN. Ainsi, après traitement avec le PMA, seul l'ADN provenant des capsides virales intègres était amplifiable par PCR en temps réel.

Cependant, cette technique ne permet pas d'explorer l'intégrité de l'enveloppe virale. Cet élément du virus est fondamental pour son pouvoir infectieux. C'est l'enveloppe qui permet au virus de pénétrer dans les cellules cibles. Afin de préciser si un contact avec les pesticides pouvait avoir une incidence sur l'enveloppe des particules virales, des animaux ont été injectés avec une suspension virale ayant subi au préalable une incubation avec le mélange de polluants. Cette approche a ainsi permis d'explorer la conservation du pouvoir infectieux du virus après un contact avec des pesticides. En effet, le contact préalable de la suspension virale avec les polluants n'a pas été associé à une réduction des mortalités observées chez les huîtres injectées laissant suspecter la présence de virons intègres possédant une enveloppe.

Aucun effet significatif du mélange de pesticides sur la stabilité du virus (capside et enveloppe) en suspension n'a été observé au cours de l'étude. Le mélange de pesticides ne semble donc pas affecter la structure du virus dans les conditions testées, quelle que soit la concentration utilisée (1X à 200X).

La sensibilité d'huîtres creuse, *C. gigas*, à l'infection virale a également été explorée en conditions expérimentales, après un contact préalable pendant 24h des animaux avec le mélange de pesticides à deux concentrations (1X et 10X). L'infection a été induite par injection d'une suspension virale dans le muscle adducteur après « anesthésie » des animaux. La mortalité a été suivie pour les différentes conditions testées pendant une période de neuf jours.

Concernant les effets du mélange de pesticides sur les huîtres, les résultats montrent une augmentation de la mortalité des animaux suite à l'infection à OsHV-1 après un contact préalable d'une courte durée (24h) avec le mélange de pesticides à la plus forte concentration testée (10X). En effet, à partir du cinquième jour et jusqu'au neuvième jour, une mortalité plus importante a été observée pour les animaux ayant été en contact avec les pesticides. Cette augmentation de la mortalité peut être interprétée comme une augmentation de la sensibilité à l'infection virale après un contact avec les polluants en comparaison avec les animaux ayant reçu l'injection d'une suspension virale sans traitement préalable avec les xénobiotiques. Ainsi, nous avons observé dans un premiers temps que le mélange de pesticides n'avait pas d'effet sur le virus OsHV-1 lui-même au travers des essais réalisés. Nous voulions nous assurer que la modification de la sensibilité à l'infection virale après un contact préalable avec le mélange de pesticides ne provenait pas d'un effet direct des polluants sur le virus. Ces résultat suggèrent que la diminution de la survie observée lors d'une infection virale à OsHV-1 après un contact préalable avec le mélange de pesticides, était associée aux effets des polluants sur les huîtres creuses elles-mêmes. En conditions expérimentales, le mélange de 14 pesticides testé semble induire une augmentation de la sensibilité à l'infection virale.

Sousmis à Chemosphere

Pesticides and ostreid herpesvirus 1 infection in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Pierrick Moreau¹, Nicole Faury¹, Thierry Burgeot² and Tristan Renault¹

¹ Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Ronce les Bains, 17390 La Tremblade, France

² Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Ifremer Research Unit of Biogeochemistry and Ecotoxicology, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

*Corresponding author: Tristan Renault

Ifremer

Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques 17390 La Tremblade, France

Phone: 33 5 46 76 26 10

Fax: 33 5 46 76 26 11

Email: tristan.renault@ifremer.fr

Abstract

Since 2008, mass mortality outbreaks have been reported in all French regions producing Pacific oysters, and in several Member States of the European Union. Many pesticides are detected in French coastal waters, especially in areas of oyster production. These mass mortality events of Pacific oysters are related to OsHV-1 infection. They occur during spring and summer periods leaving suspect the quality of the marine environment and the role of seasonal use of pesticides associated with the arrival of freshwater in oyster rearing areas. Using PMA real-time PCR we showed that a mixture of 14 pesticides has no effect on the integrity of virus capsids from viral suspension. A contact of oysters with this pesticide mixture was related to higher mortality rates among experimentally infected animals in comparison with control ones (no previous pesticide exposure before experimental infection). We therefore suggest that pesticides at realistic concentration can exert adverse effects on Pacific oysters and causes an increased susceptibility to the viral infection in experimental conditions.

Key Words: pesticides, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, infection, OsHV-1, mortality

Introduction

Since the early 90s, recurring mortality events have been associated with the detection of a herpesvirus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Nicolas et al. 1992; Renault et al. 1995). This virus named ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) can be considered one of the major infectious agents affecting farmed oysters in France. Since 2008, mass mortality outbreaks (spat and juvenile) have been reported in all French regions producing oysters, and in several Member States of the European Union. Available data suggest that OsHV-1 is a major cause with the detection since 2008 of a particular viral genotype, called μ Var (Segarra et al. 2010; Renault et al. 2012).

Pesticides have become more frequently detected among the pollutants found in estuarine and coastal areas (Renault 2011; Masuda et al. 2012; Savage et al. 2012). Pesticides may have major ecological consequences and could endanger organism growth, reproduction or survival (Banerjee et al. 1996). Many studies have been published concerning pollution and increased disease susceptibility in vertebrates (Yin et al. 2011; Stanojlović et al. 2013; Baker et al. 2013) and some data are now also available in invertebrates (Gagnaire et al. 2007). Many pesticides are detected in French coastal waters, especially in oyster production areas. Pacific oysters filter large volumes of seawater and may accumulate or metabolize contaminants within their tissues (Ramu et al. 2007; Bernal-Hernández et al. 2010). The presence of pesticides in seawater appears an environmental risk for the Pacific oyster, *C. gigas*, already documented through previous works (Rostagno et al. 1999; Gagnaire et al. 2003; Tanguy et al. 2005; Gagnaire et al. 2007). Mass oyster mortality outbreaks related to OsHV-1 infection occur during spring and summer periods (Segarra et al. 2010) and

can leave suspect the quality of the marine environment (Renault 2011) and the role of seasonal use of pesticides associated with the arrival of freshwater in oyster farming areas (Burgeot et al., 2008). The presence of pesticides in these areas could make oysters more vulnerable to infectious agents present in the environment, particularly OsHV-1.

In this context, the effects of a mixture of 14 pesticides at realistic concentrations were studied to determine whether the mixture could affect the susceptibility of Pacific oyster to OsHV-1 infection. In a first step, tests consisted of studying the effect of the mixed pesticides at different concentrations (1X, 10X and 200X) on viral suspensions during a 24 hours period. The effect of pesticides on the integrity of viral capsids was investigated using a propidium monoazide (PMA) real-time PCR. In a second step, the susceptibility of Pacific oysters, *C. gigas*, to viral infection was investigated in experimental conditions, after a previous contact during 24 hours with the mixture of pesticides at two concentrations (1X and 10X). Oyster survival was monitored for the different conditions tested during 9 days post-infection. Oysters belonging to a family presenting moderate susceptibility to the viral infection were used in the present study in order to better appreciate the negative or positive effects of pesticide on OsHV-1 infection susceptibility.

Materials and methods

Pacific oysters

Within the framework of the EU funded project Bivalife (FP7, 2011-2014), 45 biparental families of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were produced in the Ifremer's facilities located in La Tremblade (Charente Maritime, France). These oyster families demonstrated contrasted susceptibility to different pathogens including OsHV-1. One of these families (F22) was selected on the basis of its moderate level (around 50% mortality rates), of susceptibility after experimental OsHV-1 infection. It was selected in order to better appreciate a possible adverse effect of pesticides on survival in experimentally infected animals. For this family, all animals tested were aged less than one year (11 months).

Pesticides

Fourteen pesticides were selected based on their detection in the aquatic environment in Brittany and Charente Maritime (« CORPEP Bretagne, qualité des eaux ») and their immunotoxic potential for invertebrates. They belonged to 4 pesticide groups (herbicides, fongicides, insecticides and molluscicides). The mixture of the 14 selected pesticides (carbaryl, fosetyl aluminium, alachlor, métolachlor, glyphosate, atrazine, terbuthylazine, diuron, AMPA, bentazon, tebuconazol, imidacloprid, mancozeb and metaldehyde) (Moreau et al. 2014) (Table 1) was tested as well as metaldehyde alone. Solvents were used as recommended by manufacturers (Table 1) and final solvent

concentration was less than 0.5% in order to avoid effects of the solvent. Pesticides were purchased from Fluka and Supelco (Sigma-Aldrich).

Experimental design

In vitro

Assays were carried out to study the effect of the pesticide mixture *in vitro* on viral (OsHV-1) suspension (Schikorski et al. 2011). Three concentrations of pesticide mixture were tested (1X, 10X and 200X) (Moreau et al. 2014) with 24 hours exposition at 15°C in a dark.

Quantification of non-broken capsid in viral suspension by PMA real-time PCR

PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenol dichloride; Biotium, Inc., Hayward, CA) was prepared in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) to obtain a concentration of 20mM. The PMA stock solution was transferred to tubes contained 280 µL of viral suspension at a final concentration of 500 µM. The same quantity of seawater (without PMA) was added to the viral suspension for the negative control. Light-transparent 1.5-ml microcentrifuge tubes were used. All manipulations of PMA solution were performed under minimal light to prevent any potential chemical change in PMA structure, as it is a light-sensitive molecule. Following 10 min of incubation in the dark with agitation (600 rpm), samples were exposed for 10 min to Phast Blue light (Taskin et al. 2011) for tube with PMA, and 10 min in a dark for tube without PMA.

DNA extraction from viral DNA suspension with and without PMA treatment was carried out using DNA Extraction Kit QIAmp (Qiagen) under minimal light. OsHV-1 DNA quantification was performed describe bellow (cf. OsHV-1 DNA quantification by real-time PCR). The percentages of viral non-broken capsids were defined as the a ratio OsHV-1 DNA quantification with PMA / OsHV-1 DNA quantification without PMA.

In vivo

Pesticide contamination. Pacific oysters were exposed with the mixture of 14 pesticides during 24h. Oysters were not fed during the pesticide contamination. Temperature of seawater in tanks was maintained between 19.5°C and 20°C. Two tanks were used in each experiment: 1 tank with pesticides (105 oysters) and 1 tank without pesticides (105 oysters) receiving the same quantity of solvent used for preparing pesticides (the solvent was added in the water; negative controls) (Fig. 1).

Experimental viral infection. After pesticide exposition during 24 hours, experimental OsHV-1 infection was carried out by intramuscular injection of a viral suspension. Two hundred and ten oysters were “anaesthetized” during 4 h (Schikorski et al. 2011). One hundred µL of a OsHV-1 (µVar genotype, (Segarra et al. 2010; Renault et al. 2012)) suspension at 1×10^4 copies of viral DNA/µL or sterile artificial water were injected :

(A) oysters injected with sterile artificial seawater (3 tanks with seawater for oysters without pesticides, 6 tanks with seawater for oysters with pesticide exposition) (Fig. 1) or

(B) oysters injected with OsHV-1 suspension (3 tanks with seawater for oysters without pesticides, 6 tanks with seawater for oysters with pesticide exposition) (Fig. 1),
or

(C) oysters injected with OsHV-1 suspension treated with pesticides 10X (3 tanks with seawater for oysters with pesticide exposition) (Fig. 1).

Oysters placed in tanks containing 3 L of filtered seawater (1 μ m) at 22 °C without food supply (ten oysters per tank) (Fig. 1).

Survival was monitored during nine days after injection. Percentages of cumulative survival were defined daily for the different conditions. Dead oysters were removed from tanks during the time course of the experiment. The experiment was performed three times.

DNA extraction

Total DNA was extracted from mantle fragments using QiAamp tissue mini kit® (QIAGEN) combined with the use of the QIAcube automate, according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 200 μ L of AE buffer provided in the kit. The DNA quality and quantity were determined using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Extracted DNA was stored at -20°C or 4°C for OsHV-1 DNA quantification.

OsHV-1 DNA quantification by real-time PCR

OsHV-1 DNA quantification was carried out using a real-time PCR protocol (Segarra et al. 2014). Real-time PCR was performed in duplicate using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). Amplification reactions were performed in a total volume of 20 μ L. Each well contained 5 μ L of genomic DNA (5 ng/ μ L), 10 μ L of Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Master Mix (Agilent), 2 μ L of each primer (5 μ M: OsHVDPFor 5'ATTGATGATGTGGATAATCTGTG3'; and 5 μ M OsHVDPrev 5'GGTAAATACCATTGGTCTTGTTC 3'; Webb et al. 2007) and 1 μ L of distilled water. Real-time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s, 60°C for 20 s. The results were expressed as a log₁₀ of the virus DNA copy number per ng of total DNA.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Wilcoxon - Mann Whitney test by statistical software R, to compare two groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare more than two groups. The null hypothesis (H₀) corresponding to the distribution of the quantitative variable is the same in the groups. Significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**). This test were used for all experiments.

LogRank test and Wilcoxon – Mann whitney tests were performed to compare survival oysters between the differents conditions. Significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**).

Results

In vitro

No significant effect of the pesticide mixture on the integrity of OsHV-1 capsids from the viral suspension was observed during the study regardless of the concentration of the pesticide mixture used (1X, 10X and 200X). The percentage of viral integrated particles was 12% for viral suspension without pesticides (Fig. 2). For viral suspensions exposed to the pesticides mixture for 24 hours, the percentage of viral particles was :

- 11,4% for OsHV-1 suspension exposed to the pesticides mixture (1X) (Fig. 2),
- 8,02% for OsHV-1 suspension exposed to the pesticides mixture (10X) (Fig. 2),
- 11,78% for OsHV-1 suspension exposed to the pesticides mixture (200X) (Fig. 2).

Real-time PCR assays carried out in presence and absence of PMA gave similar results (Fig. 2).

In vivo

Higher mortality rates were reported for Pacific oysters experimentally infected (injected with the viral suspension without previous contact with pesticides) after a 24 h contact of animals with the 14 pesticide mixture at the highest concentration tested (10X) in comparison with oyster controls (oysters experimentally infected in absence of a previous contact with pesticides) (Fig. 3). From 5 days pi to 9 day pi, increased mortality rates were observed in the presence of pesticides (10X) (Fig. 3: P10X and

OsHV-1)). After a contact with the pesticides mixture at both concentration tested (1X and 10X), no mortality was observed for oysters receiving an injection of sterile seawater (Fig. 3: Pesticides 1x and Pesticides 10x). Higher mortality rates were also reported for oysters experimentally infected through a injection of a virus suspension previously treated with the pesticides mixture at the highest concentration tested (10X) before injection into the adductor muscle (Fig. 3: OsHV-1 susp. + P10X). Regarding the lower concentration (1X) of the pesticide mixture, no significant difference in terms of oyster survival was observed between the different conditions (Fig. 3: P1X and OsHV-1).

OsHV-1 DNA was quantified 20 h post infection. For condition OsHV-1 without pesticides, the viral DNA was 5.6×10^5 viral DNA copies per ng of total DNA at 20 h pi (Fig. 4: OsHV-1). For condition OsHV-1 with pesticides exposure:

- the viral DNA was 2.1×10^5 viral DNA copies per ng of total DNA at 20 h pi for the lower concentration of pesticides (Fig. 4: P1X and OsHV-1),
- the viral DNA was 2.3×10^5 viral DNA copies per ng of total DNA at 20 h pi for the higher concentration of pesticides (Fig. 4: P10X and OsHV-1).

No significant differences were observed between conditions (Fig. 4). There is no viral DNA quantification for injection of a virus suspension previously treated with the pesticides mixture at the highest concentration tested (10X).

Discussion

In a first step, direct effects of the pesticide mixture on the virus itself were explored. The tests consisted of studying potential effects of pesticides on viral suspensions in *in vitro* assays using 3 concentrations (1X, 10X and 200X). Pesticide effects on the integrity of virus capsids were investigated by PMA real-time PCR. Propidium Monoazide (PMA) is a photo-reactive dye that preferentially binds to double-stranded DNA (Lin et al. 2011; Taskin et al. 2011). Only broken viral capsids allow PMA penetration and DNA binding. Blue light illumination (Fast blue apparatus) induces a photochemical reaction that leads to covalent binding of viral DNA and PMA. PMA binding to viral DNA makes it non-amplifiable by real-time PCR. In our study, OsHV-1 DNA contained in broken capsid could bind to PMA and was not amplifiable. OsHV-1 DNA from non-broken capsids failed to bind covalently to PMA. Thus, after treatment with PMA, only viral DNA from non-broken capsids was amplifiable by real-time PCR. This technique is designed to discriminate viable pathogens and infectious ones (eg bacteria or viruses) (Parshionikar et al. 2010; Fittipaldi et al. 2010; Bae & Wuertz 2012; Kim & Ko 2012). No effect of the 14 pesticide mixture at the 3 concentrations tested was observed on the integrity of virus capsids. This result suggested that the pesticides used in the present study were not able to break OsHV-1 capsids after a 24 h contact.

Although the methodological approach used (PMA real-time PCR) allowed to appreciate potential effects on the viral capsid as broken capsids are PMA permeable (Parshionikar et al. 2010; Fittipaldi et al. 2010), it failed to identify effects on the viral envelope. The envelope is an essential structure for the entry of the virus in host cells (Reske et al. 2007; Liu et al. 2008; Shaw et al. 2010; Checkley et al. 2011) and modifications of the

viral envelop can result in reduced infectiosity. It has been already reported that pesticides can induce modifications of cell membranes (Calviello et al. 2006; Benachour & Séralini 2009). In order to explore such effects on OsHV-1 envelop, a viral suspension was treated with the pesticide mixture prior injection in the adductor muscle of oysters. This approach did not allow to observe a decrease of mortality rates suggesting that the pesticide mixture has no effect on the viral envelop and OsHV-1 infectiosity. In tested conditions, the mixture of pesticides did not induce direct effects on viral particles.

The decrease in oyster survival upon viral infection OsHV-1 after a previous contact with the pesticide mixture could be thus associated with pesticide effects on Pacific oysters themselves. Under experimental conditions, a 24 hours contact with the mixture of 14 pesticides was related to increased mortality rates that could be interpreted as an increased susceptibility of Pacific oysters to OsHV-1 infection. A previous study showed that a mixture of 8 pesticides at realistic concentrations, caused a reduction of haemocyte activities in the Pacific oyster, as well as an increased susceptibility to bacterial infection in laboratory conditions (Gagnaire et al. 2007). We therefore suggest that the mixture of 14 pesticides induced adverse effects on the immune system of oysters and caused an increase to the viral infection. Effects of pesticides on the expression of genes related to immunity were previously reported in Pacific oysters (Gagnaire et al. 2007; Luna-Acosta et al. 2012). Although a relationship between pollution and an increased susceptibility towards infectious diseases has been established in vertebrates (Fournier et al. 1988; Van Loveren et al. 2000; Jepson et al. 2005; Kim et al. 2008; Kerby & Storfer 2009; Rehman et al. 2011; Rohr et al. 2013). Mercury chloride aggravates infection with HSV-2 virus in mice by increasing the

replication and spread of the virus (Christensen et al. 1996). In the frog, *Rana pipiens*, an exposure to a mixture of six pesticides decreases lymphocytes T cell proliferation and these immunocompromised animals exhibit an increase in the prevalence of a trematode parasite (Gendron et al. 2003). Another study also showed a decrease in amphibian survival linked to the presence of a pesticide mixture and a viral disease (Kerby & Storfer 2009). Finally, atrazine significantly increased susceptibility of salamander larvae to viral infection (Forson & Storfer 2006).

Few studies attempted to link contaminants and susceptibility to pathogens in marine molluscs (Gagnaire et al. 2007; Anguiano et al. 2007; Collin et al. 2010; Greco et al. 2011). A study reported that during a contamination with copper, cadmium, mercury or zinc followed by balneation with a birnavirus, *Meretrix lusoria* mortality rates were higher than those for animals with the virus alone (Chou et al. 1998).

Pacific oysters are sessile bivalve molluscs. They appear to be organisms well suited to provide information upon the quality of coastal waters. Nowadays, estuaries are among the most contaminated areas and pesticides are detected in these areas especially during spring and summer periods. Thus, it is important to take into account possible interactions between oysters, pesticides and environmental factors in order to explain mass mortality outbreaks. It appears of great interest to compare transcriptomes based on RNAseq to better understand interactions between pesticides, the Pacific oyster immune system and pathogens. Publication of the Pacific oyster genome (Zhang et al. 2012) will also help greatly the study of genes involved in immunity. Although pesticides seems not able to directly kill oysters, they must be considered with attention as they

can be additional stress factors contributing to render oysters more susceptible to pathogens and massive mortality outbreaks.

Acknowledgments

This work was partially funded through the EU project Bivalife (n° 266157) and the Poitou Charentes Region. The authors wish to thank the Ifremer's hatchery team (LGPM) in La Tremblade and the nursery team (LSPC) in Bouin for the production of Pacific oysters.

References

- Anguiano G, Llera-Herrera R, Rojas E, Vazquez-Boucard C (2007) Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to lindane (gamma-HCH) exposure under experimental conditions. *Environ Toxicol Chem SETAC* 26:2192–2197. doi: 10.1897/06-377R3.1
- Bae S, Wuertz S (2012) Survival of Host-Associated Bacteroidales Cells and Their Relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium, and Adenovirus in Freshwater Microcosms as Measured by Propidium Monoazide-Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 78:922–932. doi: 10.1128/AEM.05157-11
- Baker NJ, Bancroft BA, Garcia TS (2013) A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci Total Environ* 449:150–156. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.056
- Banerjee BD, Koner BC, Ray A (1996) Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian J Exp Biol* 34:723–733.
- Benachour N, Séralini G-E (2009) Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem Res Toxicol* 22:97–105. doi: 10.1021/tx800218n
- Bernal-Hernández YY, Medina-Díaz IM, Robledo-Marenco ML, et al. (2010) Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicol Lond Engl* 19:819–825. doi: 10.1007/s10646-009-0459-2
- Burgeot T., Gagnaire B., Renault C., Haure J., Moraga D., David D., Boutet I., Sauriau P.G., Malet N., Bouchet V., Le Roux A., Lapègue S. Bouilly K., Le Moullac G., Arzul G., Knoery J., Bacher C., Soletchnik P. (2008). Oyster summer mortality risks associated with environmental stress. Chapter 3 in Summer mortality of

- pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest project. Edited by J.F. Samain and H. Combie. Quae Editions.107-153
- Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, et al. (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 211:87–96. doi: 10.1016/j.taap.2005.06.001
- Checkley MA, Luttge BG, Freed EO (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410:582–608. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.042
- Chou HY, Chang SJ, Lee HY, Chiou YC (1998) Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol. Jpn.*
- Christensen MM, Ellermann-Eriksen S, Rungby J, Mogensen SC (1996) Influence of mercuric chloride on resistance to generalized infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *Toxicology* 114:57–66. doi: 10.1016/S0300-483X(96)03409-9
- Collin H, Meistertzheim A-L, David E, et al. (2010) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *J Exp Biol* 213:4010–4017. doi: 10.1242/jeb.048033
- Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, et al. (2010) Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods* 168:228–232. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.011
- Forson DD, Storfer A (2006) Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecol Appl Publ Ecol Soc Am* 16:2325–2332.
- Fournier M, Chevalier G, Nadeau D, et al. (1988) Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *J Toxicol Environ Health* 25:103–118. doi: 10.1080/15287398809531192

- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, et al. (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol Amst Neth* 84:92–102. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.06.002
- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, et al. (2003) Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr Pharm Des* 9:193–199.
- Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, et al. (2003) Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135:469–476. doi: 10.1007/s00442-003-1210-y
- Greco L, Pellerin J, Capri E, et al. (2011) Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environ Toxicol Chem SETAC* 30:132–141. doi: 10.1002/etc.359
- Jepson PD, Bennett PM, Deaville R, et al. (2005) Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem SETAC* 24:238–248.
- Kerby JL, Storfer A (2009) Combined effects of atrazine and chlorpyrifos on susceptibility of the tiger salamander to *Ambystoma tigrinum* virus. *EcoHealth* 6:91–98. doi: 10.1007/s10393-009-0234-0
- Kim SY, Ko G (2012) Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus: Using propidium monoazide to assess viability. *Lett Appl Microbiol* 55:182–188. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03276.x
- Kim Y, Powell EN, Wade TL, Presley BJ (2008) Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar Environ Res* 65:101–127. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.09.003

- Lin W-T, Luo J-F, Guo Y (2011) Comparison and characterization of microbial communities in sulfide-rich wastewater with and without propidium monoazide treatment. *Curr Microbiol* 62:374–381. doi: 10.1007/s00284-010-9716-0
- Liu S-Q, Liu S-X, Fu Y-X (2008) Molecular motions of human HIV-1 gp120 envelope glycoproteins. *J Mol Model* 14:857–870. doi: 10.1007/s00894-008-0327-7
- Luna-Acosta A, Renault T, Thomas-Guyon H, et al. (2012) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere* 87:1335–1340. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Masuda M, Satsuma K, Sato K (2012) An environmental fate study of methoxychlor using water-sediment model system. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:73–77.
- Moreau P, Burgeot T, Renault T (2014) Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:4940–4949. doi: 10.1007/s11356-013-1931-3
- Nicolas JL, Comps M, Cochenne N (1992) Herpes-like virus infecting pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*
- Parshionikar S, Laseke I, Fout GS (2010) Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl Environ Microbiol* 76:4318–4326. doi: 10.1128/AEM.02800-09
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269–276. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.022
- Ramu K, Kajiwarra N, Isobe T, et al. (2007) Spatial distribution and accumulation of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and organochlorine

- pesticides in blue mussels (*Mytilus edulis*) from coastal waters of Korea. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 148:562–569. doi: 10.1016/j.envpol.2006.11.034
- Rehman H, Mohan A, Tabassum H, et al. (2011) Deltamethrin Increases *Candida albicans* infection susceptibility in mice. *Scand J Immunol* 73:459–464. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02521.x
- Renault T (2011) Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know? *Pestic. Mod. World - Risks Benefits*
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, et al. (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res* 26:539–543.
- Renault T, Moreau P, Faury N, et al. (2012) Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 86:5942–5947. doi: 10.1128/JVI.06534-11
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, et al. (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17:205–215. doi: 10.1002/rmv.531
- Rohr JR, Raffel TR, Halstead NT, et al. (2013) Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. *Proc Biol Sci* 280:20131502.
- Rostagno B, Violleau A, Brun C, et al. (1999) Qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais : Bilan et diagnostic.
- Savage C, Thrush SF, Lohrer AM, Hewitt JE (2012) Ecosystem services transcend boundaries: estuaries provide resource subsidies and influence functional diversity in coastal benthic communities. *PloS One* 7:e42708. doi: 10.1371/journal.pone.0042708

- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, et al. (2011) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* 42:27. doi: 10.1186/1297-9716-42-27
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, et al. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153:92–99. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Shaw PL, Kirschner AN, Jardetzky TS, Longnecker R (2010) Characteristics of Epstein-Barr virus envelope protein gp42. *Virus Genes* 40:307–319. doi: 10.1007/s11262-010-0455-x
- Stanojlović O, Nikolić T, Hrnčić D, et al. (2013) Ontogenetic influence on rat susceptibility to lindane seizure after pretreatment with phencyclidine. *Environ Toxicol Pharmacol* 35:161–170. doi: 10.1016/j.etap.2012.12.006
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J* 272:390–403. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04479.x
- Taskin B, Gozen AG, Duran M (2011) Selective Quantification of Viable *Escherichia coli* Bacteria in Biosolids by Quantitative PCR with Propidium Monoazide Modification. *Appl Environ Microbiol* 77:4329–4335. doi: 10.1128/AEM.02895-10
- Van Loveren H, Ross PS, Osterhaus AD, Vos JG (2000) Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicol Lett* 112-113:319–324.
- Webb, S. C., Fidler, A., & Renault, T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272(1), 126-139.

Yin L, Lu L, Prasad K, et al. (2011) Genetic-based, differential susceptibility to paraquat neurotoxicity in mice. *Neurotoxicol Teratol* 33:415–421. doi: 10.1016/j.ntt.2011.02.012

Zhang G, Fang X, Guo X, et al. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54. doi: 10.1038/nature11413

Figure legends

Figure 1. Design of pesticide exposition and experimental viral infection

Figure 2. Percentages of viral non-broken capsids

Figure 3. Survival (%) monitoring during experimental viral infection (OsHV-1) after exposure to the mixture of pesticides for 24h

Figure 4. Viral DNA quantification 20h post-infection

Table 1. Final concentrations of the pesticide mixture and the solvents used

Figure 1

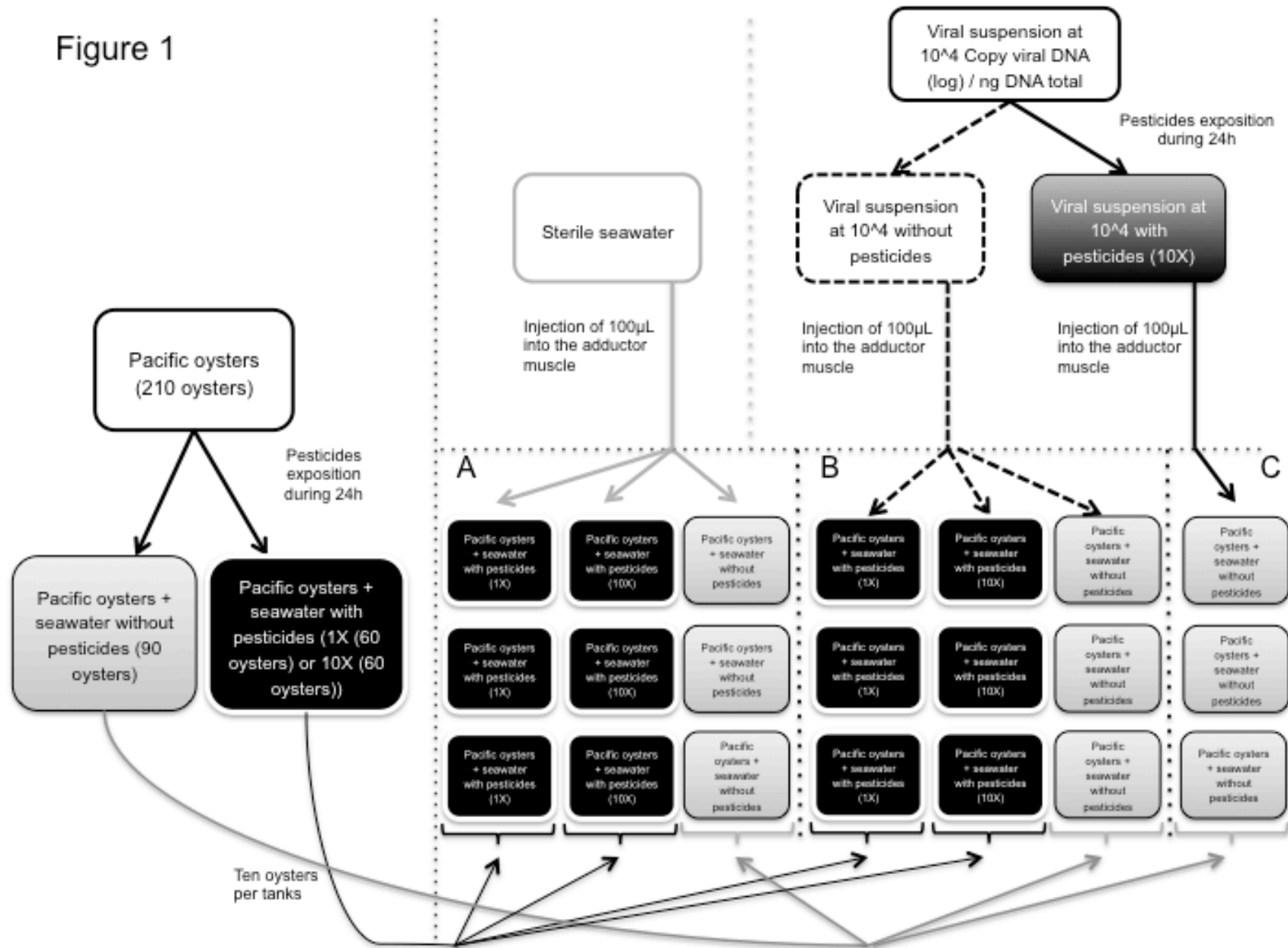


Figure 2

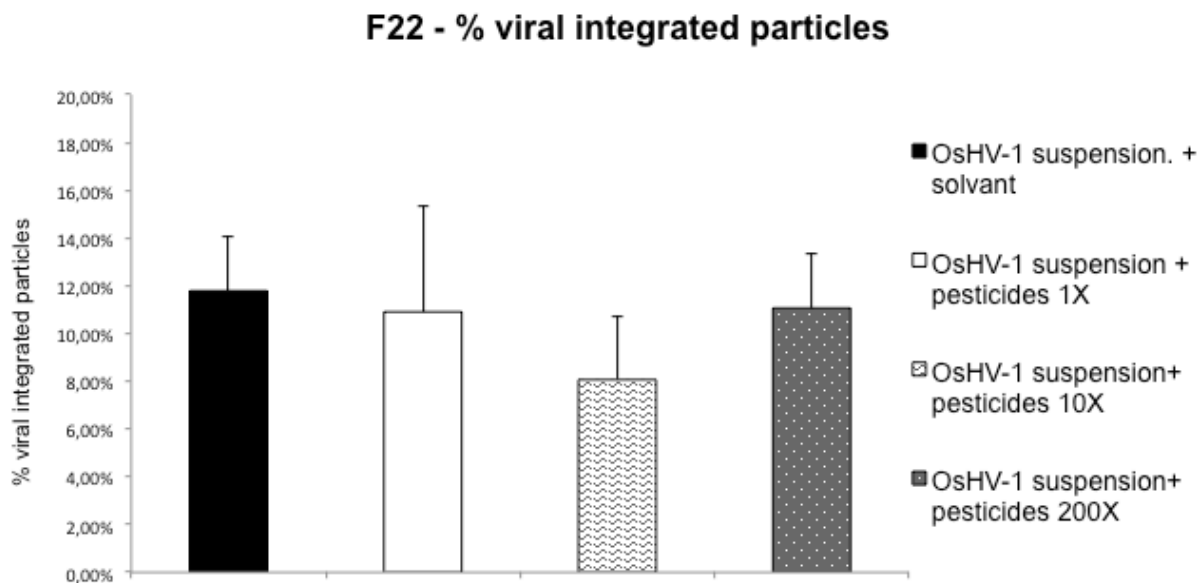


Figure 3

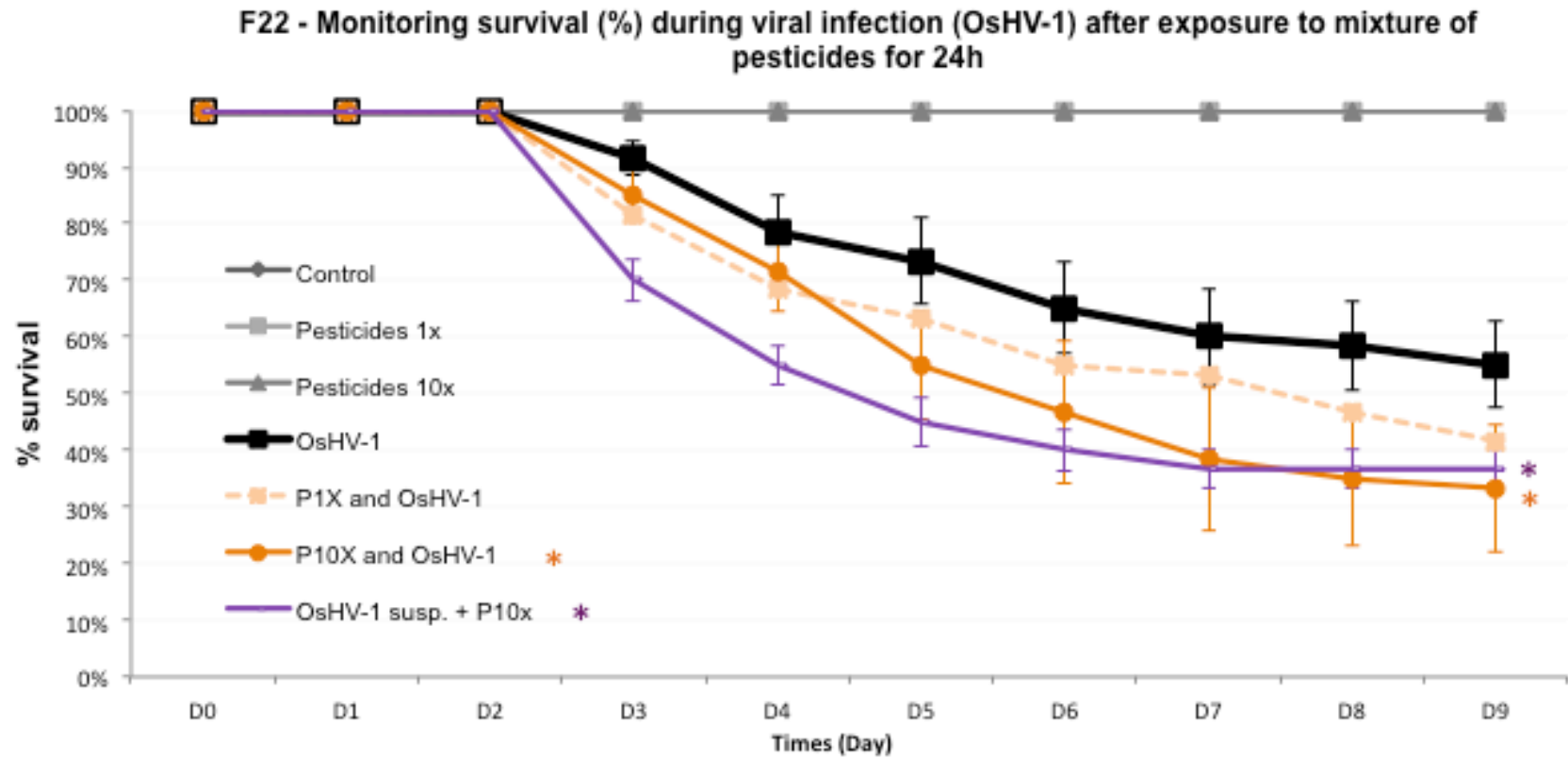


Figure 4

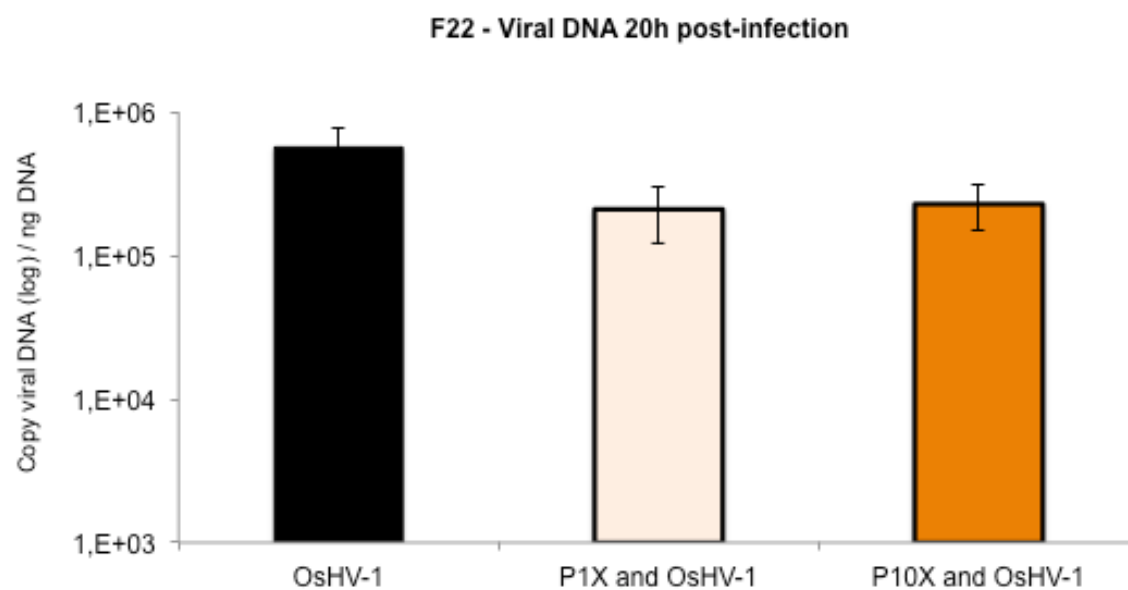


Table 1

Pesticides (solvent)	Groupe	Concentration µg/L (1x)*	Concentration µg/L (10x)	Concentration µg/L (200x)
Carbaryl (CH)	Insecticide	0.05	0.5	10
Fosetyl Al	Fongicide	0.6	6	120
Alachlor (MeOH)	Herbicide	0.8	8	160
Métolachlor (AN)	Herbicide	1	10	200
Glyphosate	Herbicide	4	40	800
Atrazine (MeTE)	Herbicide	0.1	1	20
Terbutylazine	Herbicide	0.6	6	120
Diuron	Herbicide	2	20	400
AMPA	Herbicide	2.5	25	500
Bentazon	Herbicide	0.5	5	100
Tebuconazol	Fongicide	3	30	600
Imidacloprid (AN)	Insecticide	0.1	1	20
Mancozeb	Fongicide	0.1	1	20
Metaldehyde	Molluscicide	0.1	1	20

Solvents: CH. cyclohexane; MeOH. methanol; AN. acetonitrile; MeTE. methyl terbutyl ether

* environmentally relevant concentrations

Conclusion et discussion

Depuis 2008, des mortalités massives ont été signalées dans toutes les régions françaises productrices d'huîtres, et plusieurs Etats Membres de l'Union Européenne. De nombreux pesticides sont présents dans les eaux côtières françaises, en particulier dans les bassins ostréicoles. Les mortalités massives de l'huître creuse liées à OsHV-1 survenant en fin de printemps et début d'été peuvent laisser soupçonner la qualité de l'environnement marin et plus particulièrement l'utilisation saisonnière de pesticides et leur arrivée en zones côtières à cette période.

Dans un premiers temps, il a été montré que le mélange de pesticides n'avait pas d'effet sur le virus OsHV-1 lui-même. Nous voulions nous assurer que la modification de la sensibilité (augmentation ou diminution) à l'infection virale après un contact préalable avec le mélange de pesticides, ne provenait pas d'un effet direct de ces polluants sur le virus. Les résultats obtenus laissent suspecter que la persistance du virus dans l'environnement pourrait ne pas être impactée par la présence de pesticides et donc ne pas influencer directement le pouvoir infectieux du virus OsHV-1. Cependant, il est important de noter que les tests ont été réalisés sur des suspensions virales correspondant à des broyats d'animaux infectés filtrés et qu'il est possible que des composants contenus dans ces broyats puissent avoir un rôle protecteur pour le virus vis-à-vis des pesticides. Il serait d'intérêt de réaliser des expériences de stabilité des structures virales dans différents milieux (eau de mer, ...). Cependant, ce type d'expériences reste difficile à mettre en oeuvre dans la mesure où la seule source de virus correspond aujourd'hui à des animaux infectés.

Ces résultats suggèrent également que la diminution de la survie des animaux expérimentalement infectés au cours du temps après un contact avec le mélange de pesticides, était associée aux effets des polluants sur les huîtres elles-mêmes. En conditions expérimentales, le mélange de 14 pesticides induirait ainsi une augmentation de la sensibilité à l'infection à OsHV-1 chez l'huître creuse. Une précédente étude a montré, qu'un mélange de huit pesticides, entraînait une diminution de certaines activités des cellules immunitaires chez cette espèce, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à une infection bactérienne en conditions de laboratoire (Gagnaire *et al.*, 2007).

Les huîtres creuses étant des mollusques bivalves et des animaux incapables de se déplacer, apparaissent comme des organismes de choix pour apporter des informations sur la qualité des eaux littorales. Aujourd'hui les estuaires font partie des zones les plus contaminées et l'on y retrouve notamment des pesticides. Il est important de prendre en compte les interactions possibles entre les huîtres, les pesticides et les facteurs environnementaux et un contrôle des apports en pesticides dans le milieu marin est une clé pour préserver ou restaurer la qualité des eaux littorales (plan Ecophyo 2018).

Pour conclure, les pesticides ne semblent pas capables d'induire de manière directe des mortalités chez les huîtres (aucune mortalité n'a été observée dans l'ensemble des bacs contenant des huîtres n'ayant été qu'au contact des pesticides sans infection virale) Cependant, ces molécules (représentatives des polluants qui peuvent être détectés dans les bassins ostréicoles) peuvent être un facteur de stress supplémentaire fragilisant les animaux et pourraient participer ainsi à déclencher ou aggraver les épisodes de mortalité massive d'huîtres creuses.

Chapitre III :

**Autophagie et infections chez l'huître
creuse, *Crassostrea gigas***

La troisième partie de la thèse a été consacrée à l'étude de l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*. L'étude de ce processus a consisté dans une première étape en la recherche *in silico* de gènes impliqués dans cette voie et des protéines correspondantes par western blotting. Puis, le rôle de ce processus important dans l'immunité innée a été exploré au travers d'essais de reproduction d'infections en présence ou non de modulateurs de l'autophagie. Les résultats obtenus sont rapportés sous forme d'un article (Article n°4).

Depuis 2008, l'industrie ostréicole, qui repose principalement sur la production de l'huître creuse, *C. gigas*, a été touchée par des épisodes de mortalité massive en France et en Europe. En 2008, ces épisodes touchant majoritairement des huîtres âgées de moins d'un an ont eu lieu simultanément sur la majorité des sites de production français. Les huîtres échantillonnées au cours des épisodes de mortalité ont montré des niveaux élevés de détection d'ADN du virus OsHV-1, avec un génotype viral particulier décrit pour la première fois en 2008 et nommé μ Var. En outre, depuis 2012, une bactérie, *V. aestuarianus* a été rapportée dans les huîtres adultes français présentant de fortes mortalités. Dans des conditions expérimentales, les isolats de *V. aestuarianus* induisent des mortalités importantes chez des huîtres saines (Garnier *et al.*, 2007).

Dans ce contexte de maladies infectieuses, il y a un besoin urgent de mieux comprendre le système immunitaire des huîtres afin d'identifier des pistes innovantes pour le contrôle des infections à OsHV-1 et *V. aestuarianus*. Dans ce sens, la voie de l'autophagie a été étudiée chez l'huître creuse, puisqu'il a été démontrée que cette voie joue un rôle important dans l'immunité innée dans différents modèles (Deretic, 2006 ; Levine & Deretic, 2007 ; Deretic & Levine, 2009).

Article 4 : “Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections”

Les huîtres vivent dans les eaux marines ouvertes et sont directement exposées à des agents pathogènes. Chez ces animaux la vaccination au sens conventionnel n'est pas possible pour les protéger contre les infections. En conséquence, la plupart des stratégies actuellement utilisées pour d'autres espèces animales d'élevage ne peuvent pas être appliquées directement. Les quelques approches prometteuses pour limiter les effets des agents pathogènes reposent essentiellement sur la définition de moyens applicables pour stimuler le système immunitaire et la sélection d'animaux plus résistants.

L'autophagie est un mécanisme de dégradation intracellulaire qui est hautement conservée de la levure aux plantes et aux animaux. L'autophagie a été étudiée chez les eucaryotes supérieurs et son rôle dans la dégradation d'agents pathogènes (bactéries et virus) a été bien décrit (Deretic & Levine, 2009 ; Orvedahl *et al.*, 2010). Cependant, on connaît peu de chose sur l'autophagie chez les mollusques et l'autophagie n'a jamais été décrite chez l'huître creuse, *C. gigas*.

Dans cette étude, nous avons montré que des gènes de l'autophagie (ATG : Autophagy-related gene) sont présents dans le génome de l'huître creuse. La voie de l'autophagie semble jouer un rôle dans la protection de l'huître contre les infections par le virus OsHV-1 et la bactérie *V. aestuarianus*, et la stimulation de l'autophagie est apparue associée à une meilleure survie des animaux infectés. Les résultats montrent également que les familles d'huîtres, qui ont des sensibilités différentes vis à vis de l'infection virale et de l'infection bactérienne, ne modulent pas l'autophagie avec la même amplitude.

Date de soumission : 6 Aout 2014

Journal of Autophagy : In press

**Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from
OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections**

Pierrick Moreau¹, Kevin Moreau², Amélie Segarra¹, Delphine Tourbiez¹, Marie-Agnès Travers¹, David Rubinsztein² and Tristan Renault^{1*}

¹ Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Ronce Les Bains, 17390 La Tremblade, France

² Department of Medical Genetics, Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge CB2 0XY, England, UK

*Corresponding author: tristan.renault@ifremer.fr

Phone: 33 5 46 76 26 10

Fax: 33 5 46 76 26 11

Key Words: Autophagy, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, OsHV-1, *Vibrio aestuarianus*

Abbreviations: ATG, autophagy-related; DNA, Deoxyribonucleic acid; LC3, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (ATG8); LC3-II, ATG8–phosphatidylethanolamine; PCR, Polymerase Chain Reaction; NH₄Cl, Ammonium chloride; OsHV-1, Ostreid herpesvirus 1

Abstract

Recent mass mortality outbreaks around the world in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, have seriously affected the aquaculture economy. Although the causes for these mortality outbreaks appear complexe, infectious agents are involved. Two pathogens are associated with mass mortality outbreaks, the virus ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) and the bacterium *Vibrio aestuarianus*. Here we describe the interactions between these two pathogens and autophagy, a conserved intracellular pathway playing a key role in innate immunity. We show for the first time that autophagy pathway is present and functional in Pacific oysters and plays an important role to protect animals from infections. This study contributes to better understand the innate immune system of Pacific oysters.

Introduction

Since 2008, the oyster aquaculture industry, which mainly relies on the production of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has been affected by mass mortality outbreaks in France and Europe. In 2008, mass mortality of Pacific oysters aged one year or less, occurred simultaneously on the majority of French production sites. These young oysters were decimated by 40-100% depending on the site and groups while older animals were less affected¹⁻³. Mortality outbreaks of French oyster spat then recurred every year. Oysters sampled during mortality events showed high levels of detection of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA, a virus from malacoherpesviridae family and a particular genotype of OsHV-1 was described for the first time in 2008 and named μ Var^{2,4,5}. This is a major concern for the future of all participants in the oyster industry. In addition, in 2012 and 2013, a bacterium, *Vibrio aestuarianus* has been reported in French Pacific adult oysters suffering high mortality outbreaks. In experimental conditions, isolates of *Vibrio aestuarianus* induced significant mortality in oysters initially healthy^{6,7}.

In the context of mass mortality outbreaks, there is an urgent need to better understand the immune system of oysters in order to potentially find new ways to control OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections. Pacific oysters live in open marine waters and are directly exposed to pathogens. They also lack an adaptive immune system. Conventional vaccination is therefore not an option to protect them against infections. As a consequence, most strategies currently used for other farmed animal species (e.g., cattle, fish) cannot be directly applied to Pacific oysters. The few promising approaches to limit the harmful effect of pathogens in oyster production mainly rely on defining applicable ways to stimulate the oyster immune system and selecting more resistant animals⁸.

We studied autophagy, a well conserved pathway, as it plays an important role in innate immunity⁹⁻¹¹. Autophagy is an intracellular degradation pathway that is highly conserved from yeast to plants and animals^{12,13}. In the first steps of autophagosome formation, a portion of cytoplasm is surrounded by a unique double-membraned, cup-shaped structure called the phagophore^{13,14}. Autophagosomes result from the

extension and fusion of the edges of the phagophore^{13,14}. Ultimately, autophagosomes fuse with lysosomes (in metazoan cells) or vacuoles (in yeast and plant cells). The inner membrane of the autophagosome and the cytoplasm-derived materials contained in the autophagosome are then degraded by lysosomal/vacuolar hydrolases. Autophagy has been extensively studied in higher eukaryotes and its role in pathogen degradation (bacteria and viruses) has been well described^{9–11,15}. However, little is known about autophagy in molluscs^{16–18} and autophagy has never been described in the Pacific oyster, *C. gigas*. The recent publication of Pacific oyster genome¹⁹ has opened up new possibilities to study innate immunity and particularly autophagy. In this study, we show that *ATG* genes are present in the Pacific oyster genome. Oyster *ATG* genes appear to be closer to human genes than those found in *Drosophila* or *C. elegans*. We also show that autophagy pathway plays a role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections, and autophagy stimulation is associated with oyster survival. Interestingly, we observe that Pacific oyster families, which have low or high susceptibility to OsHV-1 or *V. aestuarianus* infections, did not modulate autophagy with the same amplitude. This study shows for the first time a protective role of autophagy against OsHV-1 and *V. aestuarianus* infections in Pacific oysters in experimental conditions and suggests a potential strategy to fight against these infections by selecting animals that have high autophagy induction potential.

Results

Autophagy in Pacific oyster

A phylogenetic analysis was carried out and showed that genes involved in autophagosome formation (*ATG* genes) are present in the Pacific oyster genome (Figure 1A). Many of them share similarities with human autophagy genes (*ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG6/Beclin1*, *ATG9A*, *ATG16L1* and *ATG8/LC3*; Figure 1A). Most of the oyster *ATG* genes presented higher homologies to human genes than those of model organisms such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* (Figure 1A). Only *ATG1*, a serine/threonine-protein kinase, involved in early steps of autophagosome formation, showed divergence compared to human *ATG1* (Figure 1A).

Among these *ATG* genes, *ATG8/LC3* is important as its protein decorates the autophagosomes and the protein level of lipid-conjugated *ATG8/LC3* (*LC3-II*) correlates with the number of autophagosome present inside the cells ¹². A glycine residue at position 120 in oyster *LC3* protein was reported suggesting that the *LC3* conjugation system is functional (Figure 1B).

By western blot, we observed the presence of two bands when using a specific antibody against *LC3*, corresponding to *LC3-I* and *LC3-II*, as previously described in the literature ¹². To confirm the specificity of *LC3-II* band and to test if autophagy pathway was functional, oysters were treated with non-toxic concentration of ammonium chloride (*NH4Cl*), which impairs autophagosomes degradation by preventing autophagosome-lysosome fusion (Figure 1C, S1A, S1B). *LC3-II* accumulated dramatically in *NH4Cl* treated conditions (Figure 1C). Moreover, autophagosome formation was also induced in oysters using carbamazepine, which has previously been shown to induce autophagy ²⁰. As seen in Figure 1C, carbamazepine-treatment caused an accumulation of *LC3-II* in the presence and absence of *NH4Cl*, indicating an induction of autophagy.

OsHV-1 infection and autophagy

To test the role of autophagy during *OsHV-1* infection, different approaches were used. We first analysed the levels of *LC3-II* by western blot and observed an increase in *LC3-II* in experimentally infected oysters (in mantle tissue) in the presence or absence of *NH4Cl*, suggesting that viral infection triggered autophagy (Figure 2A and 2B). As oyster groups with different degrees of mortality after viral infection were available ²¹, the survival of animals with different susceptibility to *OsHV-1* infection was monitored in *NH4Cl* treated condition (F39; Figure 2C). *NH4Cl* treatment in experimentally infected oysters increased mortality and had more severe effects in the highly susceptibility group (Figure 2C). *NH4Cl* treatment only (without viral infection) did not induce any mortality of oysters. By contrast, animals treated with carbamazepine showed less mortality upon experimental infection in both tested oyster groups (Figure 3A).

To understand the role of NH₄Cl and carbamazepine during experimental viral infection, viral DNA, which correlates with viral replication, was quantified 20h post-infection. No change was observed in viral DNA levels in NH₄Cl treated animals in comparison with control oysters, while a decrease was observed in carbamazepine treated condition (Figure 3B). These data suggest that autophagy may participate in virus degradation when stimulated.

ATG genes are expressed differently between different oyster groups challenged with OsHV-1

In the same experiment, we performed real-time PCR to analyse the expression of ATG genes (*ATG1*, *ATG8* and *ATG6/Beclin1*; Figure 4). Expression of *ATG1* and *ATG8* were down-regulated upon early time points of infection in highly susceptible animals (Figure 4). *ATG6* was down-regulated but at a later time point (26h). In contrast, we observed that *ATG1* and *ATG6* were up-regulated at 8h and 12h post-infection in low susceptible animals (Figure 4). After a phase of induction of *ATG1* and *ATG6* expression, there was a decrease or a return of expression back to control conditions 72h post-infection (Figure 4). These data suggest that high susceptible animals were not able to induce autophagy gene expression upon infection as well as animals with low susceptibility to OsHV-1. Moreover, there may be a feedback regulation of autophagy gene expression in low susceptible animals consistent with decrease of viral DNA during the time course of the experiment ²¹.

***Vibrio aestuarianus* infection and autophagy**

In addition to OsHV-1, *Vibrio aestuarianus* is associated with mortality outbreaks in Pacific oysters. Thus, the effect of *V. aestuarianus* infection on autophagy was explored. We observed a decrease of LC3-II in the presence of NH₄Cl, suggesting that this bacterium may inhibit autophagy (Figure 5A). As observed with OsHV-1 infection, Pacific oyster families show different susceptibility to *V. aestuarianus* infection and for a single family susceptibility to the viral infection can differ from its susceptibility to the

bacterial infection. In the survival assay, we observed that NH₄Cl treatment increased oyster mortality upon bacterial infection whereas carbamazepine treatment protected the animals in both high and low susceptible groups in experimental conditions (Figure 5C). These data suggest that autophagy plays a protective role against both *V. aestuarianus* and OsHV-1 infections. When measuring bacterial DNA content, we observed a dramatic increase in NH₄Cl treated conditions and a clear decrease in carbamazepine conditions 20h post-infection (Figure 5D). These data suggest that autophagy could degrade bacteria and that inhibition of autophagy led to fatal bacterial infection.

Discussion

Autophagy is an important pathway involved in the maintenance of cellular homeostasis. Perturbations of autophagy have been associated with several diseases, such as neurodegenerative diseases, diabetes, cancers and infectious diseases^{12,13,22}. Autophagy is an important regulator of innate immunity as it helps clear pathogens and control the inflammatory response^{9–11,15}. As oysters do not develop acquired immunity, we decided to study autophagy as it might represent a major defence against pathogens. The recent publication of the oyster genome allowed us to observe that *ATG* genes are conserved in Pacific oysters. Using phylogenetic tools, *ATG* genes from oysters showed greater similarities to their human orthologues compared to those in *Drosophila melanogaster* or *Caenorhabditis elegans*. We also observed that autophagy pathway is functional in oysters, as seen by the presence of the membrane-bound form of LC3 (LC3-II) by western blot, which is associated with autophagosomes, and also as seen by the accumulation of LC3-II when oysters were treated with NH₄Cl that inhibits autophagosome-lysosome fusion, therefore accumulating autophagosomes. LC3 is primarily a cytosolic protein (called LC3-I). During autophagosome formation, LC3-I is processed by ATG4 to expose a glycine residue at its C-terminus at position 120, which allows its conjugation to phosphatidylethanolamine (PE), which is mediated by ATG7 and ATG3 (Figure 1B)^{13,14}. The LC3 is conjugated to PE on autophagosomal precursor membranes. Moreover, autophagy can be stimulated in oysters by a treatment with

carbamazepine, a known autophagy inducer²⁰. These data indicate that there is an autophagy flux in oysters, meaning that autophagosomes can be formed and fuse with lysosomes where their content can be degraded. The two autophagy modulators used in this study appeared to inhibit (NH₄Cl) or induce (carbamazepine) autophagy so we used these compounds for the rest of our analysis to modulate autophagy.

We examined the role of autophagy during experimental infections, using two pathogens that have been associated with high mortalities during the last decade, a virus from malacoherpesviridae family called OsHV-1 and a bacterium belonging to the *Vibrio* genus, *Vibrio aestuarianus*. Our data suggest that autophagy may play a protective role in oysters against OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections as seen by survival assay when autophagy was inhibited by NH₄Cl treatment or induced by carbamazepine. However, these data need to be interpreted with the caveat that these compounds have autophagy-independent actions.

By western blot, we observed that autophagy is induced during OsHV-1 infection and inhibited (NH₄Cl condition) during *Vibrio aestuarianus* infection. These data suggest that the two pathogens have different interactions with autophagy. This has been already described in the literature^{9–11,15}. Some pathogens can use autophagy for their own benefit, while others tried to evade autophagy^{10,23–25}. More work is required to understand the different interactions between OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* with autophagy. However, this will be limited by the lack of classical tools. There is no oyster cell line that can be used to produce OsHV-1 *in vitro*.

However, we observed a clear decrease of bacterial DNA when autophagy was stimulated and an increase when autophagy was inhibited, suggesting that bacteria are cleared by autophagosomes. In the context of OsHV-1, we observed a decrease of viral DNA when autophagy was stimulated, but no increase when autophagy was inhibited, suggesting that viral particles may be cleared when autophagy is induced.

Finally, mortality outbreaks are often observed during spring and summer where concentrations of algae, which represent the main source of energy for oysters, are important. It is well known that starvation is a potent stimulus of autophagy. Thus, it would of interest to analyse if there is a correlation between food supply, autophagy and mortality outbreaks.

In conclusion, we show for the first time that autophagy is conserved and functional in Pacific oysters and autophagy is an important defence mechanism against two pathogens, OsHV-1 and *V. aestuarianus*, associated with mortality outbreaks that affect oyster economy.

Materials and methods

Pacific oysters

Within the framework of the European project Bivalife (FP7, 2011-2014), 45 bi-parental families of Pacific oysters, *C. gigas*, were produced at Ifremer's facilities (LGPM, La Tremblade) in order to obtain biological material presenting contrasted susceptibilities to different pathogens, including OsHV-1 and *V. aestuarianus*. Four of the 45 bi-parental families were selected on the basis of their susceptibility to the viral infection in experimental conditions, as well as their susceptibilities to the bacterial infection. Two families (F39 and H4) had moderate mortality rates and one family (H18) presented high mortality rates after experimental OsHV-1 infection. Family F39 presented high mortality rates and family F7 presented moderate mortality rates after experimental *V. aestuarianus* infection. cDNA from two other families (Family A with low mortality rates; Family P with high mortality rates after experimental OsHV-1 infection) already used in a previous study ²¹ were used for ATG gene expression.

Another group of animals was also used. They were produced at Ifremer's facilities located in Argenton (Brittany). This oyster group (Bri) presented high mortality rates after experimental OsHV-1 infection.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed on ATG protein sequences derived from the Pacific oyster genome and genomes of model organisms using 3 computational approaches (Neighbor-Joining (NJ) method; Maximum Likelihood; Maximum Parsimony). Bootstrap data sets (1000 replicates) were generated. All approaches were implemented using the MEGA5 program.

Antibodies and reagents

Antibodies used in this study include rabbit anti-LC3B (Cell Signaling) for Western blotting, rabbit anti-actin (Sigma-Aldrich) and mouse anti-tubulin (Sigma-Aldrich). Reagents also include ammonium chloride (NH₄Cl) (Sigma-Aldrich) (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/09718?lang=fr®ion=FR>) and carbamazepine (Sigma-Aldrich) (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/94496?lang=fr®ion=FR>).

Modulation of autophagy

To inhibit autophagosome degradation, oysters were treated with NH₄Cl at 1mM during 20 h in aquariums (3L). To induce autophagy, oysters were treated with carbamazepine at 0.1mM during 20h in aquariums (3L).

Viral infection: intramuscular injection of OsHV-1 suspension

Two hundred and ten oysters were “anaesthetized” during 4 h in a solution containing magnesium chloride (MgCl₂, 50 g/L) in seawater (1 v)/distilled water (4 v)³. One hundred µL of a OsHV-1 (µVar genotype, ^{2,4}) suspension at 1×10^4 copies of viral DNA/µL were injected into the adductor muscle and oysters placed in tanks containing 3 L of filtered seawater (1 µm) at 22 °C without food supply (ten oysters per tank). Survival was monitored during five days (experiment with F39 and Bri) or six days (experiment with H4 and H18) after injection. Percentages of cumulative survival were

defined daily for the different conditions (1) oysters injected with OsHV-1 suspension (two tanks with seawater, two tanks with seawater supplemented with NH₄Cl at 1mM and two tanks with seawater supplemented with carbamazepine at 0.1mM), or (2) injected with sterile artificial seawater (two tanks with seawater, two tanks with seawater supplemented with NH₄Cl at 1mM and two tanks with seawater supplemented with carbamazepine at 0.1mM). Dead oysters were removed from tanks during the time course of the experiment. The experiment was performed three times for all experiment with OsHV-1 (experiment with F39 and Bri), except for experiments with families H4 and H18 (1 time). Oysters were less than one year old for all experiments.

Bacterial infection: intramuscular injection of *Vibrio aestuarianus*

Two hundred and ten oysters were “anaesthetized” during 4 h as described above. Fifty µL of a bacterial (*V. aestuarianus* 02/041 – Purity and concentration suspension checked by plating) suspension at 1×10^4 bacterium/µL were injected into the adductor muscle and oysters placed in tanks containing 3 L of filtered seawater (1 µm) at 22°C without food supply (ten oysters per tank). Survival was monitored during six days after injection and percentages of cumulative survival were assessed daily for the different conditions (1) oysters injected with bacteria (two tanks with seawater, two tanks with seawater supplemented with NH₄Cl at 1mM and two tanks of seawater with carbamazepine at 0.1mM) or (2) injected with sterile artificial seawater (two tanks of seawater, two tanks of seawater with NH₄Cl at 1mM and two tanks of seawater supplemented with carbamazepine at 0.1mM). Dead oysters were removed from tanks during the time course of the experiment. The experiment was performed three times with *V. aestuarianus* with families F39 and F7. Oysters were more than one year old for all assays.

Western Blotting

A mantle piece (15-20 mg) was collected from each oyster for all tested conditions 20h post-infection. For each condition, two pools of five samples were analysed. For each pool, a protein extraction was carried out in 100µL of Cell extraction buffer (Invitrogen). Initially, mechanical manual grinding using pellet piston was performed and lysis on ice for 30 min in Cell extraction buffer with 1mM PMSF and a protease inhibitor cocktail (Invitrogen). Lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, and supernatants were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with TBST (TBS, 0.1% Tween-20) containing 1% nonfat dry milk and were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBST. Membranes were washed with TBST, incubated for 1 h at room temperature with 2,500x dilutions of HRP-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare Bioscience) in TBST containing 1% nonfat dry milk, and washed. Immunoreactive bands were then detected using ECL (GE Healthcare Bioscience).

DNA extraction

Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle) using QiAamp tissue mini kit® (QIAGEN) combined with the use of the QIAcube automate, according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 100 µL of AE buffer provided in the kit. The DNA quality and quantity were determined using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Extracted DNA was stored at -20°C or 4°C prior OsHV-1 detection and quantification by real-time PCR.

Relative ATG genes expression from oysters

Relative expression of three ATG genes from *C. gigas* spat was studied during experimental OsHV-1 infection at 4, 8, 12, 26 hpi for families A and P²¹ and 72 and 144 hpi for family P²¹. The relative quantification value (ratio R) was calculated using the method described by Pfaffl [64]: $R = \frac{[(E_{\text{target}})^{\Delta CT} \text{ target}(\text{control-sample})]}{[(E_{\text{EF}\alpha-1})^{\Delta CT} \text{ EF}\alpha-1 (\text{control-sample})]}$. The efficiency of each primer pair was determined by

constructing a standard curve from serial dilutions (Table 1). These three genes from Pacific oyster were (i) Serine/threonine-protein kinase atg1 (ATG1), (ii) Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (ATG8 or LC3), (iii) Beclin-1 (ATG6) (Table 1). Host gene expression was normalized to the elongation factor I (EF), as no significant differences of Ct values were observed for this housekeeping gene between several conditions during the course time ²¹. The calibrator used for the experiment were individuals sampled at time 0 hpi from each family ²¹.

OsHV-1 DNA quantification by real-time

OsHV-1 DNA quantification was carried out using a real-time PCR protocol ²⁶. Real-time PCR was performed in duplicate using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). Amplification reactions were performed in a total volume of 20 µL. Each well contained 5 µL of genomic DNA (5 ng/µL), 10 µL of Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green Master Mix (Agilent), 2 µL of each primer (3 µM: DPF and DPR) and 1 µL of distilled water. Real-time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s, 60°C for 20 s. The results were expressed as a log10 of the virus DNA copy number per ng of total DNA.

***Vibrio aestuarianus* DNA quantification by real-time PCR**

OsHV-1 DNA quantification was carried out using a real-time PCR protocol ²⁷. Real-time PCR TaqMan was performed in duplicate using a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). Amplification reactions were performed in a total volume of 20 µL. Each well contained 5 µL of genomic DNA (5 ng/µL), 10 µL of 2X Mastermix Ultra-Fast Brilliant III (Agilent), 0.06 µL of each primer (100µM: DNAj-F and DNAj-R), 0.04 µL of DNAj probe (100µM) and 4.84 µL of distilled water. Real-time PCR cycling conditions were as follow: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 60°C for 20 s. The results were expressed as a log10 of the bacterial DNA copy number per ng of total DNA.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Wilcoxon-Mann Whitney test by statistical software R, to compare two groups. The null hypothesis (H0) corresponding to the distribution of the quantitative variable is the same in the groups. Significance was set at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**).

Significance levels for comparisons between groups were determined with t tests, repeated-measure, factorial ANOVA, and/or Mann-Whitney using the STATVIEW software, version 4.53 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was partially funded through the EU project Bivalife (FP7 KBBE, contract n°266157), the Poitou Charentes Region and DPMA (Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture). David Rubinsztein is a Wellcome Trust Principal Research Fellow. The authors wish to thank the project Aestu. We thank Anna Albecka-Moreau for critical reading of the manuscript.

References

1. EFSA J. Scientific opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on the increased mortality events in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. 2010; :1894–953.
2. Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 2010; 153:92–9.
3. Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin J-F. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* 2011; 42:27.
4. Renault T, Moreau P, Faury N, Pepin J-F, Segarra A, Webb S. Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 2012; 86:5942–7.
5. Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Gu X, Read A, Go J, Dove M, O'Connor W, *et al.* Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ* 2013; 105:109–26.
6. Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas J-L. Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 2007; 53:187–96.
7. De Decker S, Normand J, Saulnier D, Pernet F, Castagnet S, Boudry P. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J Invertebr Pathol* 2011; 106:179–91.
8. Dégremont L, Bédier E, Boudry P. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 2010; 299:21–9.
9. Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:375–82.
10. Deretic V, Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe* 2009; 5:527–49.
11. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:767–77.

12. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445–544.
13. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, *et al.* Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90:1383–435.
14. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1102–9.
15. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4:151–75.
16. Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol Amst Neth* 2007; 84:80–91.
17. Moore MN. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 2008; 4:254–6.
18. Bai R, You W, Chen J, Huang H, Ke C. Molecular cloning and expression analysis of GABAA receptor-associated protein (GABARAP) from small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 33:675–82.
19. Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wang X, Qi H, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 2012; 490:49–54.
20. Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, Maurice N, Mukherjee A, Goldbach C, Watkins S, *et al.* An Autophagy-Enhancing Drug Promotes Degradation of Mutant 1-Antitrypsin Z and Reduces Hepatic Fibrosis. *Science* 2010; 329:229–32.
21. Segarra A, Mauduit F, Faury N, Trancart S, Dégremont L, Tourbiez D, Haffner P, Barbosa-Solomieu V, Pépin J-F, Travers M-A, *et al.* Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 2014; 15:580.
22. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:709–30.

23. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* 2005; 307:727–31.
24. Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, van der Goot FG, Sansonetti PJ, Lafont F. Shigella Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. *Cell Host Microbe* 2009; 6:137–49.
25. Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G. Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009; 6:367–80.
26. Pepin JF, Riou A, Renault T. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 2008; 149:269–76.
27. Saulnier D, De Decker S, Haffner P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* 2009; 77:191–7.

Figure legends

Figure 1. Autophagy in Pacific oyster. (A) Phylogenetic trees of ATG proteins, (B) Sequence alignment and glycin conservation in position 120 ; cleavage model of ATG8 and association with a phosphatidylethanolamine, (C) LC3 Western blot after contact during 20h with NH₄Cl, Carbamazepine and NH₄Cl+Carbamazepine to show autophagy flux in Pacific oysters.

Figure 2. Autophagy detection during OsHV-1 infection. (A) LC3 Western blot 20h post infection with different conditions (uninfected and infected without NH₄Cl; uninfected and infected with NH₄Cl). (B) Quantification LC3 corresponding to western blot (fig 2.A). (C) Survival curves of two oyster group (Bri and F39) during OsHV-1 infection with or without NH₄Cl.

Figure 3. Autophagy can protect oysters against OsHV-1 infection . (A) Survival curves of two oyster families (H4 and H18) during OsHV-1 infection with or without NH₄Cl and with or without carbamazepine. (B) Viral DNA quantification 20h post-infection in both families (H4 and H18).

Figure 4. ATG genes (ATG1, ATG8 and ATG6) are expressed differently in two families with differing susceptibilities to viral infection (Family A and Family P)

Figure 5. Autophagy can protect oysters from *Vibrio aestuarianus* infection. (A) LC3 Western blot 20h post infection with different conditions (uninfected and infected without NH₄Cl; uninfected and infected with NH₄Cl), also quantification of LC3 protein corresponding at the different conditions of western blot. (B) Survival curves of two oysters families (F39 and F7) during bacterial infection with or without NH₄Cl and with or without carbamazepine. (C) Bacterial DNA quantification 20h post-infection in both families (F39 and F7).

Figure S1. NH₄Cl effect on autophagy. (A) LC3 Western blot 20h post contamination with NH₄Cl at different concentrations and quantification of LC3 protein. (B) Survival of family F39 after 5 day of NH₄Cl contamination at different concentration (0 to 10mM).

Table legends

Table 1: List of oyster genes targeted by real-time PCR.

Figure 1: Autophagy in Pacific oyster

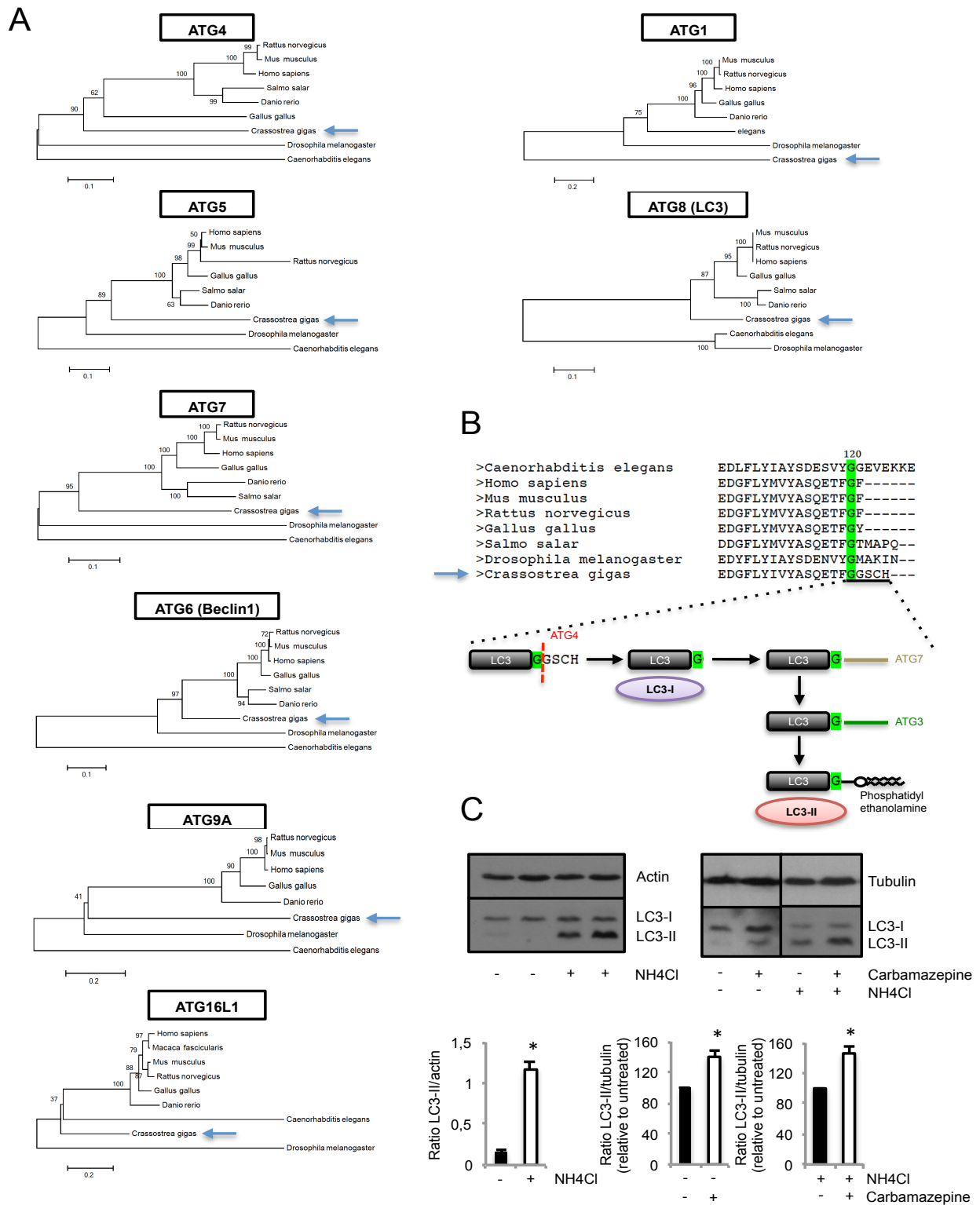


Figure 2: OsHV-1 infection induces autophagy

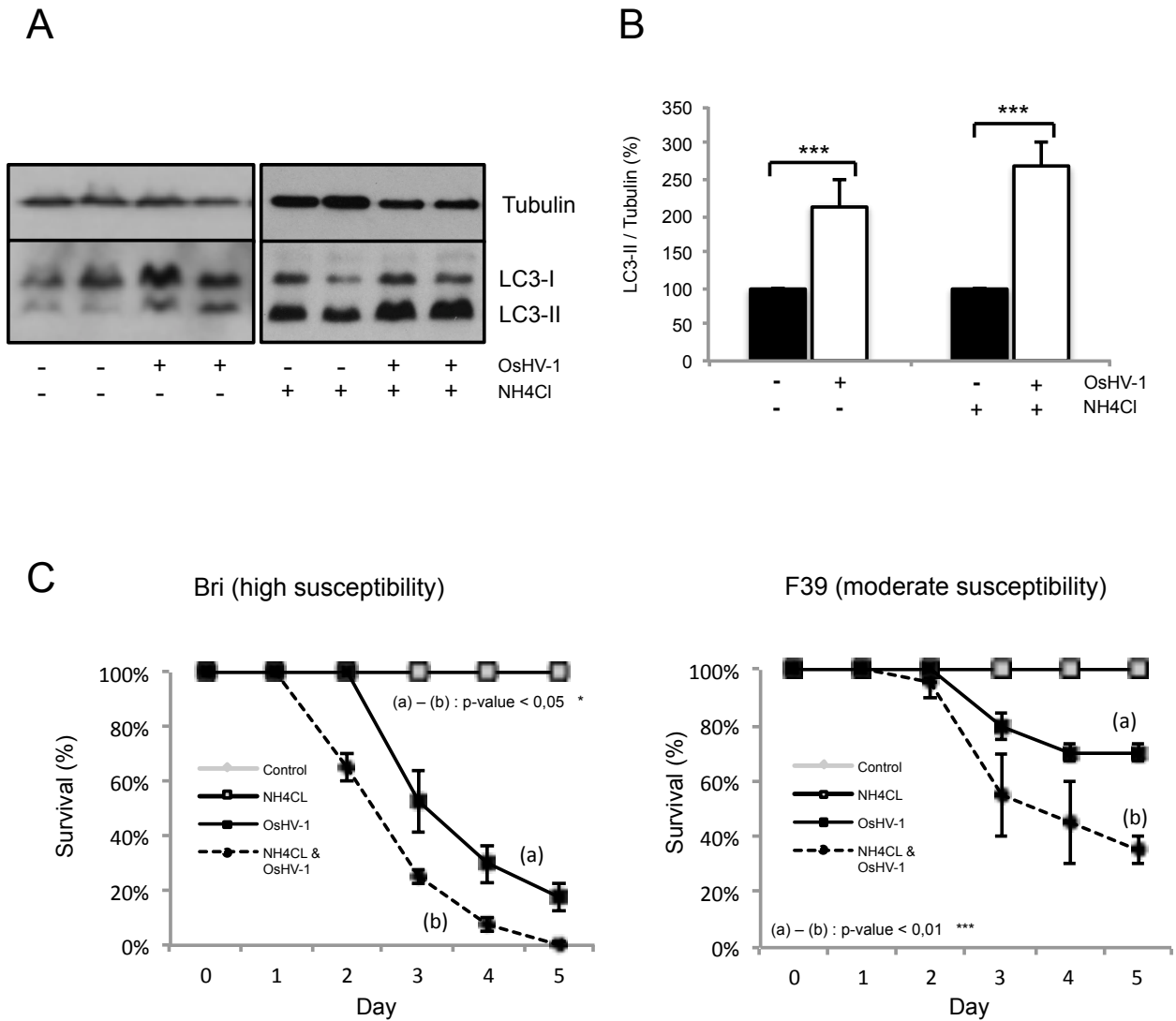


Figure 3: Autophagy plays protective role during OsHV-1 infection

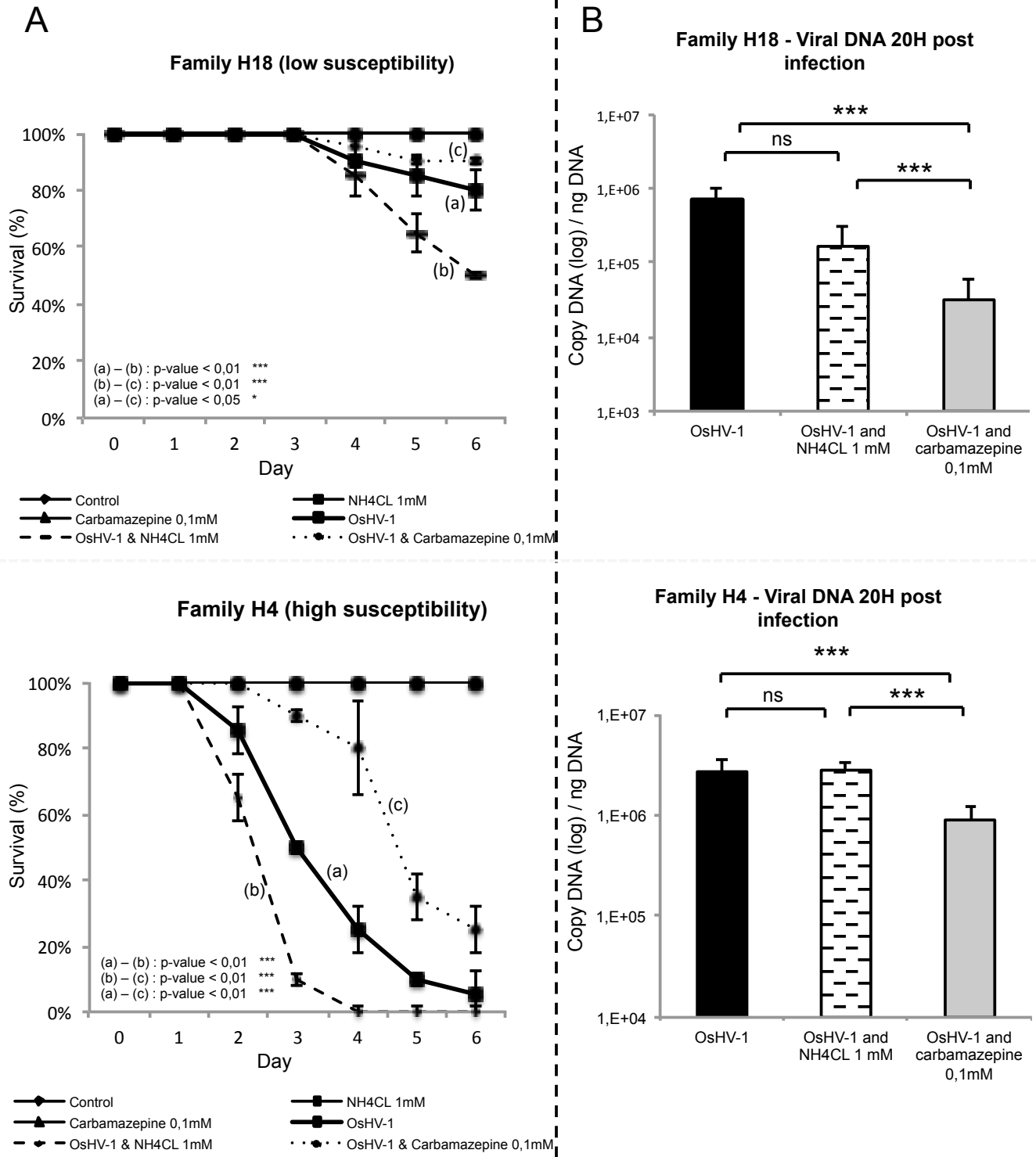


Figure 4: *ATG* genes expression in different oyster's populations challenged with OsHV-1

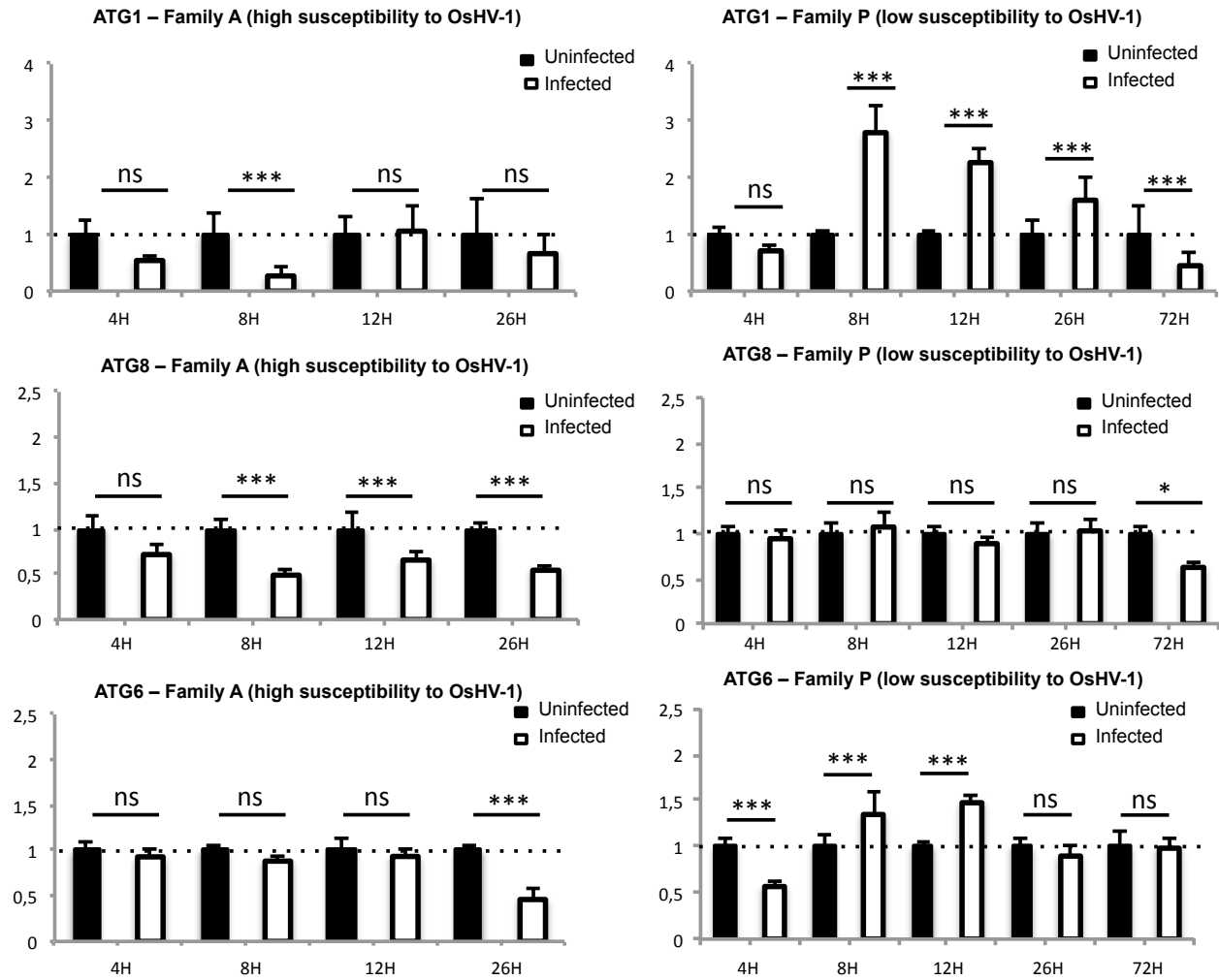
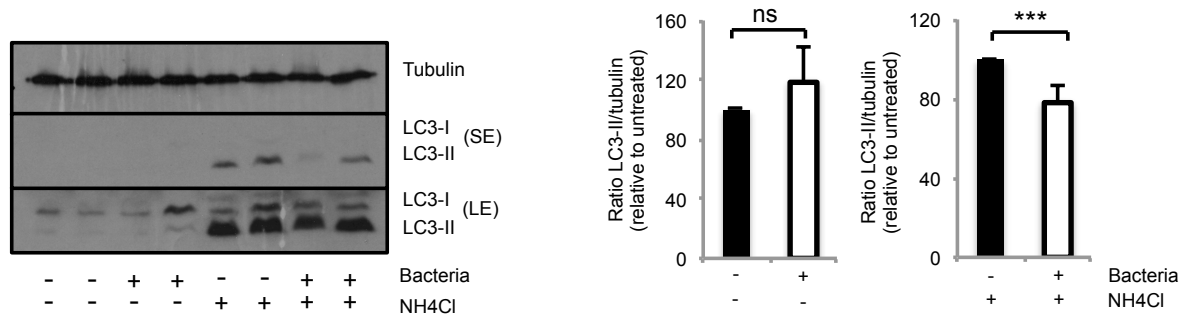
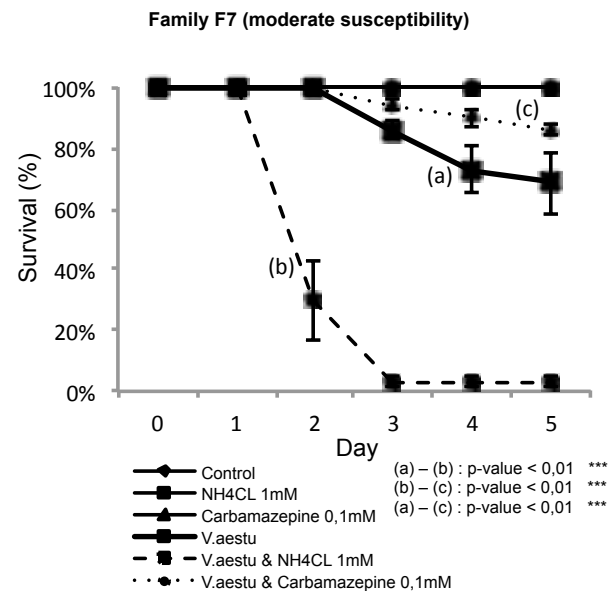
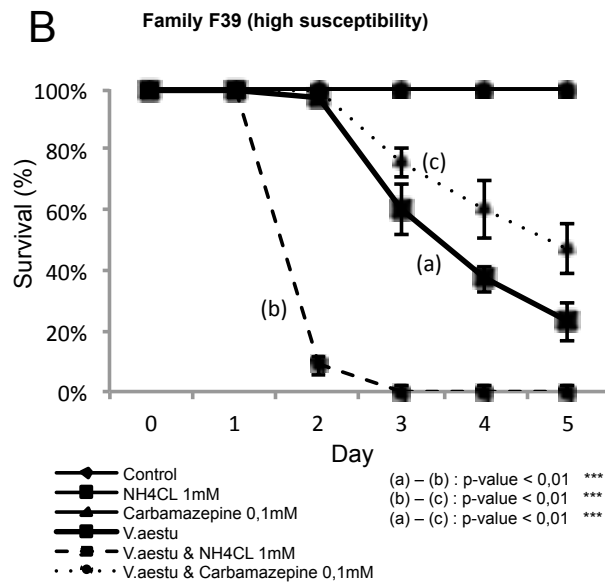


Figure 5: Autophagy protects oysters from *Vibrio aestuarianus* infection

A



B



C

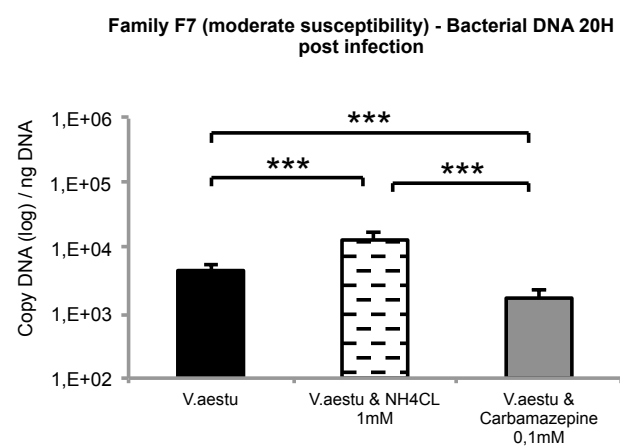
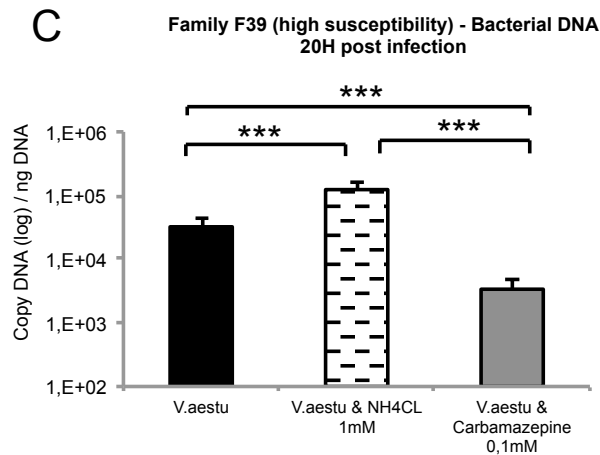


Figure S1: NH₄Cl effect on autophagy (WB and oyster survival)

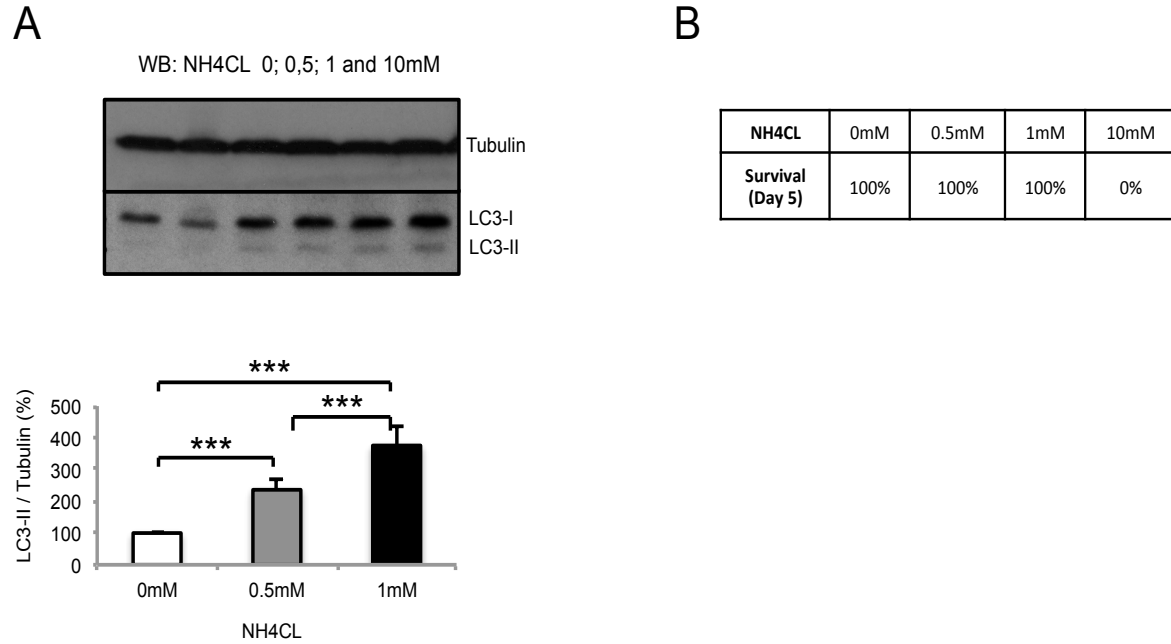


Table 1

GenBank	Gene name	Abbreviation	Forward primer Reverse primer	Efficiency (%)
	Serine/threonine-protein kinase atg1	ATG1	CAATGCGTGCGAAGAAGATG GCCGTTTCATTGTTGGGTGAT	97,7
	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	ATG8	CCGATGCTTGACAAGACCAA CCGTCCTCGTCTTCTCCTG	98,2
	Beclin-1	ATG6	AAATGCTGCTTGGGGTCAGA CGGAATCCACCAGACCCATA	102,2
AB122066	Elongation Factor	EF	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	98,8

Conclusion et discussion

L'autophagie est une voie importante impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. C'est un processus régulateur important de l'immunité innée, car elle aide à l'élimination des agents pathogènes et à contrôler la réponse inflammatoire.

Comme les huîtres ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif, il a été choisi d'étudier l'autophagie qui peut représenter une voie de défense d'importance contre les agents pathogènes chez l'huître creuse. La récente publication du génome de l'huître creuse a permis d'observer que les gènes ATG sont conservés chez cette espèce. En utilisant des outils phylogénétiques, les gènes ATG de l'huître creuse ont montré plus de similitudes à leurs orthologues humains par rapport à ceux de *Drosophila melanogaster* ou de *Caenorhabditis elegans*. Il a été montré que la voie de l'autophagie apparaissait fonctionnelle chez cette espèce, au travers de la détection par western blot de la forme de LC3 (LC3-II) liée à la membrane. Deux modulateurs du processus ont également été utilisés dans cette étude. Les deux modulateurs utilisées dans cette étude semblent inhiber (NH₄Cl) ou induire (carbamazépine) l'autophagie.

Le rôle de l'autophagie a été étudié au cours d'infections expérimentales, en utilisant deux agents pathogènes qui ont été associés à des mortalités élevées chez l'huître creuse, un virus de la famille *Malacoherpesviridae*, le virus OsHV-1 et une bactérie appartenant au genre *Vibrio*, *V. aestuarianus*. Les données suggèrent que l'autophagie peut jouer un rôle protecteur contre les deux infections. Lorsque l'autophagie est inhibée par le traitement avec le NH₄Cl ou induite par la carbamazépine des variations dans la survie des animaux infectés ont été observées. Au travers des résultats obtenus en western blot, il apparaît que l'autophagie semble induite pendant l'infection virale (OsHV-1) et inhibée pendant l'infection bactérienne (*V. aestuarianus*). Ces données suggèrent que les deux agents pathogènes ont des interactions différentes avec l'autophagie. Certains agents pathogènes peuvent utiliser l'autophagie pour leur propre bénéfice, tandis que d'autres ont développé des stratégies d'échappement (Deretic & Levine, 2009).

Des travaux complémentaires sont nécessaires pour comprendre les différentes interactions entre OsHV-1 et *V. aestuarianus* avec la voie de l'autophagie.

Enfin, les phénomènes de mortalité massive sont souvent observés au cours du printemps et de l'été, périodes à auxquelles les concentrations d'algues, qui représentent la principale source d'énergie pour les huîtres, sont importantes. Il est bien connu que le jeûne est un fort stimulant de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2008). Ainsi, il serait intéressant d'analyser s'il existe une corrélation entre la disponibilité en nutriment, l'autophagie et les épisodes de mortalité.

Discussion générale

L'objectif général de ce travail de thèse était d'apporter de nouveaux éléments afin de mieux comprendre les interactions et les relations qui peuvent exister entre l'environnement, l'huître creuse, *C. gigas*, et le virus OsHV-1. Pour cela, les recherches ont été focalisées autour de trois axes :

- les effets de pesticides en mélange et d'un molluscicide sur les activités hématocytaires d'huîtres appartenant à des familles d'huître creuse, *C.gigas*, présentant différentes sensibilités à l'infection à OsHV-1 ;
- les effets des pesticides sur le virus OsHV-1 et sur la sensibilité des huîtres à l'infection virale ;
- et l'autophagie en lien avec les infections chez l'huître creuse.

Les principaux résultats obtenus ont permis de montrer qu'un mélange de pesticides à des concentrations détectées dans des bassins ostréicoles était capable de moduler certaines activités des hématocytes de l'huître creuse, *C. gigas*, et d'induire une augmentation de la sensibilité des huîtres à l'infection à OsHV-1 en conditions expérimentales.

D'autres résultats marquants de ce travail consistent en la mise en évidence de la voie de l'autophagie chez un bivalve marin par une approche *in silico* et une approche de modulation du processus par des substances inhibitrices et inductrices. Il a ainsi été possible de montrer que l'autophagie pouvait jouer un rôle important dans la capacité des huîtres à se défendre contre une infection virale et une infection bactérienne en conditions de laboratoire.

La discussion générale est organisée en trois points principaux :

- 1) l'influence des pesticides sur certaines activités hématocytaires et la sensibilité à l'infection virale à OsHV-1 chez l'huître creuse,
- 2) le mécanisme de l'autophagie et son rôle possible comme mécanisme de défense vis à vis des maladies infectieuses chez l'huître creuse,
- 3) et la diversité génétique et la sensibilité aux infections chez l'huître creuse.

1. Influence des pesticides sur certaines activités hématocytaires et sensibilité à l'infection virale à OsHV-1 chez l'huître creuse

Les travaux réalisés ont permis de montrer que les hémocytes de l'huître creuse, *C. gigas*, sont résistants et peuvent supporter, *in vitro*, des conditions stressantes extrêmes. Aucun effet n'a été observé pour les hémocytes issus de trois familles d'huîtres différentes quels que soient les temps et les concentrations utilisées pour les pesticides en mélange ou le métaldéhyde seul. Un contrôle correspondant à une salinité de 6.5 ‰ a permis d'observer des effets sur les paramètres hémocytaires suivis et de confirmer ainsi la validité des protocoles utilisés.

Pour l'ensemble des concentrations testées (mélange de 14 pesticides (concentrations de 1X à 100X) et métaldéhyde seul (concentrations de 0.1 µg/L à 1 g/L)), aucun effet n'a été observé sur les six paramètres hémocytaires suivis (taille et complexité, mortalité cellulaire, présence d'estérases non spécifiques, calcium intra-cytoplasmique (données non montrées), présence et activités des lysosomes (données non montrées) et activité de phagocytose). Les hémocytes maintenus *in vitro* modifient très rapidement leur physiologie (Le Foll *et al.*, 2010) et semblent ainsi montrer une grande résistance à différentes conditions de stress (Gagnaire *et al.*, 2006b). L'approche *in vitro* est relativement aisée à mettre en œuvre et il serait intéressant d'explorer d'autres paramètres cellulaires, mais également de suivre l'expression de certains gènes considérés comme impliqués dans les réponses immunitaires. En effet, des modifications dans l'expression de certains gènes peuvent être des marqueurs précoces d'effet des pesticides (Tanguy *et al.*, 2005 ; Gagnaire *et al.*, 2007 ; Collin *et al.*, 2010 ; Luna-Acosta *et al.*, 2012). Également, des géniteurs d'huîtres exposés au diuron pendant sept jours aux concentrations de 0,6 µg/L montrent des dommages des hémocytes et des spermatozoïdes (Barranger *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus pour les expérimentations réalisées *in vivo* ont montré que le métaldéhyde à 0.1 µg/L (concentration moyenne détectée dans l'environnement), module certaines activités hémocytaires (mortalité hémocytaire, phagocytose et taille et complexité) pour des cellules prélevées chez des individus appartenant à deux familles d'huîtres creuses différentes, lors d'une exposition de courte durée (24 heures). Des expérimentations ont également été réalisées avec le mélange de 14 pesticides et une exposition de courte durée (24 heures). Bien que les expérimentations n'aient pas été réalisées en triplicats dans ce cas, il est apparu que le mélange

de 14 pesticides à des concentrations retrouvées dans l'environnement (1X et 10X) modulait certaines activités hémoctaires (augmentation de la mortalité hémoctaire et diminution de la phagocytose). Cependant, ces résultats ont besoin d'être confirmés. Il est toutefois intéressant de noter, qu'ils sont en accord avec ceux obtenus lors d'un essai d'infection expérimentale avec le virus OsHV-1 après un contact préalable de 24 heures avec le mélange de pesticides à la concentration 10X. Une augmentation significative de la mortalité des animaux expérimentalement infectés (aucune mortalité n'a été rapportée dans les témoins non infectés) a été observée et peut être interprétée comme une augmentation de la sensibilité des huîtres à l'infection virale après un contact préalable avec des pesticides. Par ailleurs, aucun effet des pesticides n'a été observé sur l'intégrité des particules virales (OsHV-1) dans un broyat de tissus infectés, suggérant que les pesticides provoquent des effets néfastes chez les huîtres creuses en perturbant leurs défenses immunitaires. La modulation de certaines activités hémoctaires observée *in vivo* suggèrent des effets des pesticides sur les principaux acteurs de l'immunité chez les huîtres, les hémocytes.

Cependant, il est nécessaire d'approfondir ces résultats par d'autres approches méthodologiques intégrant le suivi de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité et/ou l'expression des protéines correspondantes, comme par exemple LC3 et mTOR (González-Polo *et al.*, 2007).

Dans ce sens, il a été entrepris une analyse de l'expression d'une protéine autophagique (LC3-II) en présence du mélange de pesticides à deux concentrations (1X et 10X). Les résultats obtenus ont montré une modulation de l'autophagie (augmentation du niveau d'expression de la protéine LC3-II) en présence des pesticides pour la plus forte concentration testée (10X). Une augmentation de la protéine LC3-II peut correspondre à une activation de la voie de l'autophagie et donc une formation plus importante d'autophagosomes dans les cellules (Klionsky, 2007 ; Klionsky *et al.*, 2008). Cette augmentation peut aussi correspondre à une inhibition de la voie par blocage de la dégradation des autophagosomes et une accumulation des autophagosomes non dégradés. A la concentration 10X, une augmentation de la sensibilité des huîtres à une infection virale expérimentale a été observée en présence des pesticides. Ainsi, la modulation de l'autophagie (activation, inhibition ou blocage de l'autophagie) par certains pesticides pourrait être un facteur explicatif de l'augmentation de la sensibilité des huîtres à l'infection virale en conditions expérimentales. Cependant, il est nécessaire de répéter et de confirmer cette

modulation de l'autophagie par les pesticides à la concentration la plus élevée. Il a été montré que le paraquat (herbicide) à faible dose, était capable d'induire l'autophagie et de provoquer l'accumulation de vacuoles autophagiques dans le cytoplasme de cellules humaines (González-Polo *et al.*, 2007).

Une autre approche pour étudier la modulation de l'autophagie en présence de pesticides est le suivi de l'expression de gènes. Afin de compléter les résultats obtenus, des prélèvements ont été réalisés au cours de plusieurs expériences réalisées dans le cadre des travaux de thèse et ont été conservés afin de pouvoir mettre en oeuvre une approche par RNAseq (Wang *et al.*, 2014). Par cette approche de séquençage à très haut débit, il devrait être possible d'identifier des différences de profils d'expression lors d'une infection virale à OsHV-1 après un contact préalable avec le mélange de pesticides (10X). Luna-Acosta et coll. (2012) ont montré des effets sur l'expression de gènes liés à l'immunité chez l'huître creuse, *C. gigas*, en présence de diuron seul ou en mélange (herbicides). L'analyse du transcriptome par RNAseq pour chacune des conditions testées (injection eau de mer, injection eau de mer + pesticides 10X, injection OsHV-1 et injection OsHV-1 + pesticides 10X), devrait permettre d'identifier des niveaux de transcrits différents pour certains gènes et pourrait apporter des réponses importantes dans la compréhension des effets des pesticides chez l'huître creuse, *C. gigas*. Cette approche devrait aider à une meilleure compréhension des voies de défenses qui sont modulées par les pesticides et qui pourraient expliquer en partie les différences de sensibilité aux agents pathogènes chez cette espèce. De nos jours, il apparaît indispensable d'étudier l'impact des pesticides dans le milieu marin et ainsi pouvoir proposer des méthodes adaptées de gestion de la biodiversité dans ce milieu.

2. Mécanisme de l'autophagie et son rôle possible comme mécanisme de défense vis à vis des maladies infectieuses chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Un des points majeurs de ce travail de thèse a été la démonstration pour la première fois de l'existence de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse, ainsi que son possible rôle de protection vis à vis des infections dues à deux agents pathogènes (OsHV-1 et *V. aestuarianus*) qui induisent des mortalités chez cette espèce.

Il est important de noter qu'en utilisant des familles avec des sensibilités variées vis à vis de l'infection à OsHV-1 ou de l'infection due à la bactérie *V. aestuarianus*, la modulation de l'autophagie par des substances chimiques a entraîné des modifications des mortalités observées en conditions expérimentales. Une activation de l'autophagie par la carbamazépine a entraîné une réduction des mortalités des animaux après infection par le virus et la bactérie. Le blocage de la dégradation des autophagosomes par le NH_4Cl (blocage de l'autophagie) a entraîné une augmentation des mortalités des animaux expérimentalement infectés. Ces résultats suggèrent le rôle de protection de l'autophagie contre certains agents pathogènes chez l'huître creuse. Il est nécessaire d'approfondir l'étude de cette voie, notamment en modulant l'autophagie non plus seulement par l'utilisation de drogues déjà connues pour leurs effets sur ce processus, mais par l'utilisation d'ARN interférent. En effet, cette technique devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de l'autophagie et de leur implication dans les capacités de l'huître creuse à se défendre vis à vis des maladies infectieuses. Ainsi, des travaux sont planifiés au sein de LGPMM afin d'étudier par RNAi les effets de l'inhibition de différents gènes de l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*.

Les mortalités massives sont souvent observées au cours du printemps et de l'été lorsque les concentrations en algues, qui représentent la principale source de nutriments pour les huîtres, sont importantes. Il est bien connu que le jeûne est un stimulant efficace de l'autophagie (Scott *et al.*, 2004). Ainsi, il apparaît d'intérêt d'analyser s'il existe une corrélation entre les fluctuations de la disponibilité en nourriture, l'autophagie et les épisodes de mortalité chez l'huître creuse. Des premiers essais ont ainsi été réalisés : ils ont consisté à faire jeûner des huîtres creuses pendant quatre semaines avant de réaliser une infection expérimentale avec le virus OsHV-1. Les premiers résultats obtenus suggèrent une survie légèrement améliorée lorsque les animaux n'ont pas été nourris pendant quatre semaines. Le jeûne des animaux pourrait induire un niveau important d'autophagie et participer à une meilleure capacité des huîtres à se défendre vis à vis de l'infection virale. Des prélèvements ont été également réalisés et conservés afin de pouvoir réaliser une analyse par RNAseq des différentes conditions testées et de compléter ainsi les premiers résultats obtenus. L'abondance de la nourriture au printemps pourrait s'accompagner d'une diminution des capacités autophagiques des animaux et les rendre plus vulnérables aux maladies infectieuses. Si les résultats se confirment, cela pourrait apporter des pistes concernant

l'identification d'un risque associé à la présence de blooms phytoplanctoniques en période printanière.

Il existe d'autres agents pathogènes chez l'huître creuse. Ainsi, étudier le rôle de l'autophagie lors d'infections par ces agents pathogènes, comme par exemple lors d'une infection à *V. splendidus*, bactérie qui a été détectée lors d'épisodes de mortalités chez cette espèce apparaît comme une piste de recherche d'intérêt. Etudier l'autophagie chez d'autres espèces de bivalves comme la moule, *Mytilus edulis*, la moule, *M. galloprovincialis* ou l'huître plate, *Ostrea edulis* est un autre domaine de recherche à explorer.

Le suivi de l'expression de gènes de l'autophagie (ATG) a également montré des résultats prometteurs. En effet, lors d'une infection virale expérimentale, il a pu être mis en évidence une surexpression des gènes ATG1 et ATG6 (Beclin-1) chez les individus appartenant à une famille d'huîtres peu sensibles à l'infection à OsHV-1 (Segarra *et al.*, 2014). Or, cette surexpression n'a pas été observée chez les animaux analysés issus d'une autre famille, famille quand à elle fortement sensible à l'infection virale (Segarra *et al.*, 2014). Ces résultats montrent que le processus autophagique ne semble pas être impliqué de la même manière lors d'une infection virale expérimentale chez des animaux possédant un fond génétique différent. Ils suggèrent également qu'une activation de l'autophagie est observable chez des huîtres peu sensibles à l'infection virale alors que pour des animaux fortement sensibles cette activation ne semble pas avoir lieu. L'autophagie pourrait être un des processus d'importance permettant à certains animaux de se défendre efficacement vis à vis de l'infection virale. Une approche par RNAseq est également planifiée pour comparer les transcriptomes d'individus appartenant à ces deux familles et présentant des sensibilités contrastées à l'infection virale en conditions expérimentales.

3. Diversité génétique et sensibilité aux infections chez l'huître creuse

La diversité génétique de l'huître creuse, *C. gigas*, a été un élément important pris en compte lors de ce travail de thèse, notamment avec l'étude d'individus appartenant à plusieurs familles pour la majorité des expérimentations. Cela a permis d'obtenir des réponses différentes en fonction de l'appartenance des huîtres testées à différentes familles.

Les résultats obtenus en cytométrie en flux concernant l'étude des effets du métaldehyde sur certains paramètres hémocytaires pour des individus appartenant à deux familles d'huîtres creuses (une famille correspond à un groupe d'individus obtenus à partir du croisement entre un mâle et une femelle), ont montré des réponses différentes. Pour les cellules provenant d'individus appartenant à une famille faiblement sensible à l'infection à OsHV-1, le contact avec le métaldehyde s'est traduit par une augmentation de la mortalité hémoctaire et n'a pas eu d'effet sur les autres paramètres hémoctaires testés. Pour les hémocytes collectés à partir d'huîtres issues d'une famille fortement sensible à l'infection virale, le contact avec le métaldehyde n'a eu aucun effet sur la mortalité cellulaire, mais a été associé à une diminution du pourcentage de granulocytes et des capacités de phagocytose. Les individus des deux familles testées ont montré des comportements différents pour certaines activités hémoctaires après un contact de 24 h des cellules avec le métaldehyde. Dans ces conditions, il apparaît nécessaire de prendre en compte la diversité génétique des animaux lorsque que l'on désire explorer les effets de pesticides chez l'huître creuse (Moreau *et al.*, 2014).

La voie de l'autophagie peut participer aux capacités de défense de l'huître contre les agents pathogènes. Il a été également observé des capacités autophagique différentes, notamment au travers du suivi de l'expression de certains gènes (ATG1 et ATG6) lors d'une infection à OsHV-1 entre individus appartenant à différentes familles. Pour les individus appartenant à une famille d'huîtres qui présente peu de mortalité lors d'une infection virale expérimentale, il a été observé une surexpression de ces gènes alors que des huîtres issues d'une famille présentant de fortes mortalités suite à une infection à OsHV-1, n'ont pas montré de surexpression pour ces mêmes gènes.

Il apparaît important d'intégrer des individus appartenant à différents groupes/familles pour mieux appréhender les différences de sensibilité de l'huître creuse à différents agents infectieux et aux pesticides. Disposer de matériel biologique présentant des comportements contrastés vis à vis de certains agents pathogènes et de contaminants chimiques apparaît aujourd'hui comme une approche d'une grande utilité. Le LGPMM dispose déjà aujourd'hui de ce type de matériel qui peut être utilisé par la communauté scientifique.

Pour apporter des éléments complémentaires, il serait intéressant de réaliser de l'exome sequencing (Xu *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014) sur une dizaine de familles d'huîtres creuses, afin d'obtenir seulement la partie codante du génome pour cette espèce et de définir les mutations de certains gènes qui pourraient expliquer les différentes sensibilités à l'infection virale. Un grand nombre de maladies humaines (mucoviscidose, la myopathie de Duchenne et Becker ou certains cancers) sont dus à des mutations génétiques (Kerr *et al.*, 2013 ; Garcia *et al.*, 2014). Egalement, il a été montré chez l'homme que la prédisposition génétique jouait un rôle important dans la sensibilité à certaines maladies infectieuses et que les mutations de certains gènes pouvaient entraîner de graves maladies. Ainsi, les mécanismes génétiques et moléculaires de plusieurs déficits immunitaires qui prédisposent à une infection ont été identifiés (Casanova *et al.*, 2002 ; Alcais *et al.*, 2005 ; Picard *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Von Bernuth *et al.*, 2008). Chez l'huître creuse, les mutations génétiques et les capacités d'expression de gènes pourraient apporter de nouveaux éléments de réponse.

4. Conclusion & perspectives

Ce travail de thèse, s'inscrivant dans la problématique très actuelle des mortalités massives de naissain et de juvéniles d'huîtres creuses, *C. gigas*, et des questionnements autour de l'implication des pesticides dans ce phénomène, a permis d'apporter de nouveaux éléments qui peuvent intéresser à la fois, microbiologistes et écotoxicologistes, ainsi que les professionnels du secteur ostréicole. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que des pesticides très représentés dans différents bassins ostréicoles ont un impact sur certaines capacités hématocytaires de l'huître creuse, *C. gigas*, et ont aussi une influence sur la sensibilité des animaux aux agents infectieux chez cette espèce. La qualité de l'environnement apparaît donc comme un enjeu majeur pour permettre une conchyliculture durable. Il est donc nécessaire de bien caractériser tous les pesticides présents dans les bassins ostréicoles, et d'étudier leur effets en mélange et/ou d'un molluscicide sur les huîtres creuses.

Les résultats ont également permis de montrer pour la première fois l'existence de l'autophagie chez cette espèce et le rôle de ce processus dans l'immunité innée pour lutter contre des infections. Afin de comprendre le rôle de l'autophagie lors d'une infection virale et d'une exposition aux pesticides, il est nécessaire dans un premier temps (1) de bien caractériser les

effets de pesticides sur l'autophagie chez l'huître creuse, (2) de connaître les interactions entre le virus OsHV-1 et l'autophagie chez l'huître creuse. L'analyse du transcriptome par RNAseq et l'utilisation de l'ARN interférence chez cette espèce semblent être de bons moyens d'étude.

Au cours de cette thèse, une approche originale a été mise en place sur des familles génétiquement différentes. Ainsi pour mieux comprendre la variabilité génétique chez l'huître creuse à plusieurs stress (pesticides, virus, ...), il est nécessaire d'explorer les mécanismes ciblés par les pesticides ou le virus. Dans ce sens, une approche RNAseq devrait permettre d'obtenir de nouveaux éléments de réponses, notamment avec la comparaison des transcriptomes d'individus appartenant à des familles possédant des fonds génétiques différents et présentant des sensibilités contrastées à l'infection virale et/ou aux pesticides en conditions expérimentales.

Enfin, l'objectif final était d'intégrer les résultats obtenus en proposant un schéma d'interactions permettant de mieux appréhender les relations complexes entre l'huître creuse, le virus OsHV-1 et certains pesticides. Il paraît maintenant indispensable de réaliser des études *in situ*, pour mettre en évidence les caractéristiques de différentes familles présentant des mortalités contrastées sur le terrain, ainsi que les différences entre types d'animaux (triploïdes, diploïdes d'écloserie et diploïdes de captage naturel). Pour étudier ces caractéristiques, il serait intéressant de suivre les paramètres hématologiques et les voies de défenses étudiées dans ce travail de thèse.

Références bibliographiques

A

- Akcha F, Spagnol C, Rouxel J (2012) Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat Toxicol* 106-107:104–113. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Alan R, Ezekowitz B, Hoffmann J (1998) Innate immunity: The blossoming of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:9-11
- Alcaïs A, Mira M, Casanova J-L, et al. (2005) Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol* 17:44–48. doi: 10.1016/j.coi.2004.11.006
- Allam B., Paillard C. et Auffret M. (2000). Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, p.63-69.
- Alvarez MR, Friedl FE (1992) Effects of a fungicide on in vitro hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 107:135–140. doi: 10.1016/0044-8486(92)90058-S
- Amer AO, Swanson MS (2005). Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 7:765–778. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00509.x
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Anguiano-Beltrán C., Searcy-Bernal R. et Lizárraga-Partida M.L. (1998). Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Diseases of Aquatic Organisms* 33, p.111-118.
- Anguiano G, Llera-Herrera R, Rojas E, Vazquez-Boucard C (2007) Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to lindane (gamma-HCH) exposure under experimental conditions. *Environ Toxicol Chem SETAC* 26:2192–2197. doi: 10.1897/06-377R3.1
- Aquaculture ifremer : <http://aquaculture.ifremer.fr/>
- Arumugan M, Romestand B, Torreilles J (2000) Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquating Living Resources* 13:173-177
- Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ & Renault T (2001a) French scallops: a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, 290, 342-349.

- Arzul Isabelle, Renault Tristan, Lipart Cecile (2001b). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of aquatic organisms*, 46(1), 1-6.
- Arzul Isabelle, Nicolas Jean-Louis, Renault Tristan (2001c). Infection à virus de type herpès chez les larves de coquilles Saint-Jacques. *Journées Conchyliques Ifremer 2001*. Arzul I, Renault T, Thébault A, Gérard A (2002) Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res* 84:151–160.
- Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12, 198-202.
- Aton E, Renault T, Gagnaire B, et al. (2006) A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca²⁺ in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20:493–502. doi: 10.1016/j.fsi.2005.06.008
- Auffret M, Oubella R (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118:705–712. doi: 10.1016/S0300-9629(97)00017-0.
- Auffret, M. (1985). Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de 3ème cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 153 p.
- Azevedo C. et Villalba A. (1991). Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology* 58, p.75-81.

B

- Bachère E, Hervio D, Mialhe E, Grizel H (1990) Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Dev Comp Immunol* 14:261–268.
- Bae S, Wuertz S (2012) Survival of Host-Associated Bacteroidales Cells and Their Relationship with *Enterococcus* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and Adenovirus in Freshwater Microcosms as Measured by Propidium Monoazide-Quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 78:922–932. doi: 10.1128/AEM.05157-11
- Bai R, You W, Chen J, et al. (2012) Molecular cloning and expression analysis of GABAA receptor-associated protein (GABARAP) from small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Fish Shellfish Immunol* 33:675–682. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.003
- Baier-Anderson C, Anderson RS (2000) The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environ Res* 83:72–78. doi: 10.1006/enrs.1999.4033

- Baker NJ, Bancroft BA, Garcia TS (2013) A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci Total Environ* 449:150–156. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.056
- Banerjee BD, Koner BC, Ray A (1996) Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian J Exp Biol* 34:723–733.
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS (2001) Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health* 16:1–40.
- Barranger A., F. Akcha, J. Rouxel, R. Brizard, E. Maurouard, M. Pallud, D. Menard, N. Tapie, H. Budzinski, T. Burgeot, A. Benabdelmouna (2014). Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology* 146: 93-104.
- Bates NS, Sutton NM, Campbell A (2012) Suspected metaldehyde slug bait poisoning in dogs: a retrospective analysis of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Vet Rec* 171:324. doi: 10.1136/vr.100734
- Bayne C (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. In: *Comparative Immunology*. University of California Press, Berkeley, p 723-731
- Beattie, J.H., Chew, K.K. & Hershberger, W.K. (1980). Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 70: 184-189.
- Beckmann, N., Morse, M.P. and Moore, C.M. (1992) Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 124-132.
- Benachour N, Séralini G-E (2009) Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem Res Toxicol* 22:97–105. doi: 10.1021/tx800218n
- Bernal-Hernández YY, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, *et al.* (2010) Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicol Lond Engl* 19:819–825. doi: 10.1007/s10646-009-0459-2
- Bilan 2010 du réseau Corpep (2011) - Les pesticides dans les eaux superficielles bretonnes - Bretagne Environnement.
<http://www.bretagne-environnement.org/Media/Documentation/Bibliographies/Les-pesticides-dans-les-eaux-superficielles-bretonnes-bilan-2010-du-reseau-Corpep>
- Birmingham CL, Canadien V, Kaniuk NA, *et al.* (2008) Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* 451:350–354. doi: 10.1038/nature06479

- Blakley B, Brousseau P, Fournier M, Voccia I (1999) Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and Industrial Health* 15:119–132. doi: 10.1177/074823379901500110
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, *et al.* (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem FEBS* 243:240–246.
- Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, *et al.* (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 270:2320–2326.
- Borrego J.J., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia M.T. et Ventosa A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systemic Bacteriology* 46, p.480-484.
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8:76–85
- Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, *et al.* (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch Environ Contam Toxicol* 52:58–63. doi: 10.1007/s00244-005-0256-8
- Bretau S, Toutant JP, Saglio P (2000) Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 47:117–124. doi: 10.1006/eesa.2000.1954
- Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, *et al.* (2008) Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J Environ Sci Health B* 43:655–664. doi: 10.1080/03601230802352732
- Burge CA, Griffin FJ, Friedman CS (2006) Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis Aquat Organ* 72:31–43. doi: 10.3354/dao072031
- Burgeot T., Gagnaire B., Renault C., Haure J., Moraga D., David D., Boutet I., Sauriau P.G., Malet N., Bouchet V., Le Roux A., Lapègue S. Bouilly K., Le Moullac G., Arzul G., Knoery J., Bacher C., Soletchnik P. (2008). Oyster summer mortality risks associated with environmental stress. Chapter 3 in Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest project. Edited by J.F. Samain and H. Combie. Quae Editions.107-153

C

- Cajaraville MP, Olabarrieta I, Marigomez I (1996) In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol Environ Saf* 35:253–260. doi: 10.1006/eesa.1996.0108
- Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, *et al.* (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 211:87–96. doi: 10.1016/j.taap.2005.06.001
- Campbell A (2008) Metaldehyde poisoning of dogs. *Vet Rec* 163:343.
- Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, *et al.* (2007) Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull* 54:396–402. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.11.013
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. & Villalba, A. (1997). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 96-105.
- Casanova J-L, Abel L (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 20:581–620. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851
- Chagot, D. (1989). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Asctospora). Thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole Pratique des Hautes Etudes de Montpellier, Montpellier, 71 p.
- Checkley MA, Luttge BG, Freed EO (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410:582–608. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.042
- Cheng, T.C. & Rudo, B.M. (1976). Chemotactic attraction of *Crassostrea virginica* hemolymph cells to *Staphylococcus lactus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 137-139.
- Cheng TC (1981) Bivalves. *Invertebr Blood Cells* 233–300.
- Cheng, T.C. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology* 23: 129-144.
- Cheng, T.C. (1988). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 207-214.
- Cheng, T.C. (1990). Effects of in vivo exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. In: Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (eds). Academic Press, San Diego, CA, Academic Press, San Diego, CA, p 513-524.

- Chen, J.H. & Bayne, B.L. (1995). Bivalve mollusc hemocyte behaviours: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *Biological Bulletin* 188: 255-266.
- Cheng, T.C. (1996). Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. & Eble, F. (eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, p 299-333.
- Choi Y, Jo P, Choi C (2008) Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 147:286-292
- Chou HY, Chang SJ, Lee HY, Chiou YC (1998) Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol. Jpn.*
- Christensen MM, Ellermann-Eriksen S, Rungby J, Mogensen SC (1996) Influence of mercuric chloride on resistance to generalized infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *Toxicology* 114:57–66. doi: 10.1016/S0300-483X(96)03409-9
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G. & Ballarin, L. (2000). Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 677-693.
- Clark, S.L., Jr. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 3, 349-362.
- CNC (2011), CNC bilan 2011.
- Coles JA, Pipe RK (1994) Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4:337–352. doi: 10.1006/fsim.1994.1030
- Collin H, Meistertzheim A-L, David E, *et al.* (2010) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *J Exp Biol* 213:4010–4017. doi: 10.1242/jeb.048033
- Comps M, Cochennec N (1993) A Herpes-like Virus from the European Oyster *Ostrea edulis* L. *J Invertebr Pathol* 62:201–203. doi: 10.1006/jipa.1993.1098.
- Comps M (1988) Epizootic disease of oyster with viral infection. *American Fisheries Society Special Publication*, 18 : 23-27
- Coombs, T.L. & George, S.G. (1977). Mechanisms of immobilization and detoxication of metals in marine organisms. 12th European Symposium on Marine Biology, Stirling, Scotland, p 179-187

- Cooper EL, Roch P (2003) Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia* 47:676–688. doi: 10.1078/0031-4056-00245
- Cooreman, K., Roose, P. & Vyncke, W. (1993). Screening of organophosphate and carbamate pesticides by cholinesterase inhibition. In: Committee, I.M.E.Q. (ed) ICES Statutory Meeting 1993. ICES, Copenhagen, p 7.
- Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgol. Mar. Res.* 59, 286-300.

D

- Dai L, Wang W, Dong X, *et al.* (2011) Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:226–232. doi: 10.1016/j.etap.2011.05.007
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, *et al.* (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154:171–177. doi: 10.1007/s00705-008-0278-4
- Davison AJ, Trus BL, Cheng N, *et al.* (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86:41–53. doi: 10.1099/vir.0.80382-0
- De Decker S, Normand J, Saulnier D, *et al.* (2011) Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J Invertebr Pathol* 106:179–191. doi: 10.1016/j.jip.2010.09.003
- Dégremont L, Bédier E, Boudry P (2010) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299:21–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.017
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, *et al.* (2008) Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 27:1110–1121. doi: 10.1038/emboj.2008.31
- Deniau S (2000) Essais de propagation in vitro de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre, pp. 189.
- Deretic V (2006) Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol* 18:375–382. doi: 10.1016/j.coi.2006.05.019
- Deretic V, Levine B (2009) Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe* 5:527–549. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.016
- Deter RL, De Duve C (1967) Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* 33:437–449.

- DiSalvo L.H., Blecka J. et Zebal R. (1978). *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a california coastal shellfish hatchery. *Applied and Environmental Microbiology* 35, p.219-221.
- Dodge A (1989) Herbicides interacting with photosystem II. In: *Herbicides & plant metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p 277
- Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV (2009) The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14046–14051. doi: 10.1073/pnas.0907344106
- Dunier M, Siwicki AK, Demaël A (1991) Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22:79–87. doi: 10.1016/0147-6513(91)90049-U
- Dunier M, Siwicki AK (1993) Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. *Fish & Shellfish Immunology* 3:423–438. doi: 10.1006/fsim.1993.1042
- Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, *et al.* (2009) *Shigella* Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. *Cell Host Microbe* 6:137–149. doi: 10.1016/j.chom.2009.07.005

E

- EFSA J (2010) Scientific opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on the increased mortality events in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. 1894–1953.
- Elandaloussi L, Carrasco N, Furones D, Roque A (2009) Phylogenetic relationship of *Perkinsus olseni* from the Ebro Delta, Spain, to other *Perkinsus* species, based on ribosomal DNA sequences. *Dis Aquat Organ* 86:135–142. doi: 10.3354/dao02107
- Elston, R.A., Elliot, E.L. & Colwell, R.R. (1982). Conchiolin infection and surface coating *Vibrio* : shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Fish Diseases* 5: 265-284.

F

- Faisal M, MacIntyre E, Adham K, Tall B, Kothary M, La Peyre J (1998) Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 121:161-168
- Farley CA, Banfield WG, Kasnic G Jr, Foster WS (1972) Oyster herpes-type virus. *Science* 178:759–760.
- Feng SY (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. 18 153–168.
- Fisher, S.W. (1986). Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin, M. (ed) *Immunity in Invertebrates*, Vol 3. Springer-Vrelag, Berlin Heidelberg, p 25-35.
- Fisher, S.W. & Ford, S.E. (1988). Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 286-291.
- Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, *et al.* (2010) Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods* 168:228–232. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.011
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P. and Huvet, A. (2008) Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassastrea gigas*. *Gene* 410(1), 187-96.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012) Fishery and aquaculture statistics = Statistiques des peches et de l'aquaculture = Estadísticas de pesca y acuicultura. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome
- Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A. & Kanaley, S.A. (1994). Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 114-122.
- Forson DD, Storfer A (2006) Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecol Appl Publ Ecol Soc Am* 16:2325–2332.
- Fournier M, Chevalier G, Nadeau D, *et al.* (1988) Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *J Toxicol Environ Health* 25:103–118. doi: 10.1080/15287398809531192
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, *et al.* (2000) Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Amer Zool* 40:412–420. doi: 10.1093/icb/40.3.412
- Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, *et al.* (2005) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Organ* 63:33–41. doi: 10.3354/dao063033

G

- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, *et al.* (2003) Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr Pharm Des* 9:193–199.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 16:501–512. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007>
- Gagnaire, B. (2006). Étude des effets des polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de Doctorat. La Rochelle.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006a) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 22: 1–14
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T (2006b) Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol* 20: 536–547
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, *et al.* (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol Amst Neth* 84:92–102. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.06.002
- Galloway TS, Depledge MH (2001) Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicol Lond Engl* 10:5–23.
- Galloway T, Handy R (2003) Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12:345–363.
- Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, *et al.* (2009) Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes. *Cell Host Microbe* 6:367–380. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.005
- Garcia C, Thébault A, Dégremont L, *et al.* (2011) Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet Res* 42:73. doi: 10.1186/1297-9716-42-73
- Garcia S, de Haro T, Zafra-Ceres M, *et al.* (2014) Identification of de novo Mutations of Duchenné/Becker Muscular Dystrophies in Southern Spain. *Int J Med Sci* 11:988–993. doi: 10.7150/ijms.8391
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, *et al.* (2007) Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 53:187–196. doi: 10.1007/s00248-006-9061-9

- Gay M., Berthe F.C. et Le Roux F. (2004a). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, p.49-56.
- Gay M., Renault T., Pons A.M. et Le Roux F. (2004b). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, p.65-74.
- Gay M. (2004). Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas*: étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, 179p.
- Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, *et al.* (2003) Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranæ*. *Oecologia* 135:469–476. doi: 10.1007/s00442-003-1210-y
- George, S.G. & Pirie, B.J.S. (1980). Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 575-590.
- George, S.G., Coombs, T.L. & Pirie, B.J.S. (1982). Characterization of metal-containing granules from the kidney of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 716: 61-71.
- Goedken, M. and De Guise, S. (2004) Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol* 16(4),539-52.
- Gonzalez M., Romestand B., Fievet J., Huvet A., Lebart M.-C., Gueguen Y. et Bachère E. (2005). Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, p.1089-1097.
- Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 40-47.
- Goulletquer, P., & Heral, M. (1997). Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, 129.
- Goulletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, *et al.* (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). *CIEM Cons. Int. Pour Explor. Mer*
- Greco L, Pellerin J, Capri E, *et al.* (2011) Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environ Toxicol Chem SETAC* 30:132–141. doi: 10.1002/etc.359
- Grinwis G. G., van den Brandhof E. J., Engelsma M. Y., Kuiper R. V., Vaal M. A., Vethaak A. D., Wester P. W., Vos J. G. (2001). Toxicity of PCB-126 in European flounder

- (*Plitichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P4501A induction in several organ systems. *Arch Toxicol*, 75(2) : 80-87.
- Green TJ, Montagnani C, Benkendorff K, et al. (2014) Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 36:151–157. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.026
- Grizel H, Comps M, Cousserans F, Bonami JR & Vago C (1974) Study of a parasite of the digestive gland observed during the current epizootic of the flat oyster. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 279(9):783-4.
- Grizel, H. (1996). Quelques exemples d'introduction et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15: 401-408.
- Guan J, Stromhaug PE, George MD, et al. (2001) Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* 12:3821–3838.
- Gueguen Y, Cadoret J, Flament D, Barreau-Roumiguier C, Girardot A-L, Garnier J, Hoearreau A, Bachère E, Escoubas J (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303:139-145

H

- Hada H.S., West P.A., Lee J.V., Stemmler J. et Colwell R.R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, p.1-4.
- Hamann MT, Otto CS, Scheuer PJ, Dunbar DC (1996) Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp.(1). *J Org Chem* 61:6594–6600.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 293, 249-265.
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, et al. (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 22:433–440. doi: 10.1016/j.fsi.2006.06.014
- Héral, M. (1989). L'ostéiculture française traditionnelle. In: Lavoisier (ed) *Aquaculture*. Barnab., Paris, p 347-397.
- Héral, M. & Deslous-Paoli, J.M. (1991). Oyster culture in European countries. In: Menzel, W. (ed) *Estuarine and Marine bivalve mollusk culture*. CRC Press, Boca Raton, p 153-190.

- Hidvegi T, Ewing M, Hale P, *et al.* (2010) An Autophagy-Enhancing Drug Promotes Degradation of Mutant 1-Antitrypsin Z and Reduces Hepatic Fibrosis. *Science* 329:229–232. doi: 10.1126/science.1190354
- Hine PM & Thorne ET (1997). Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871): an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29 : 189-196.
- Hine, P.M. (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 367-385.
- His E, Heyvang, Isabelle, Geffard Olivier, De Montaudouin Xavier (1999) A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*). Larval bioassays for toxicological studies.
- Huvet A., Royer J., Moal J., Burgeot T., Lapègue S. Boulo V., Nicolas J.L., Lambert C., Van Wormhoudt A., Samain J.F. (2008). Phenotypic characteristics of ‘R’ and ‘S’ oyster lines, selected for resistance or susceptibility to summer mortality. Chapter 5 in in Summer mortality of pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest project. Edited by J.F. Samain and H. Combie. *Quae Editions*.197-243.
- Hyne RV, Aistrop M (2008) Calibration and field application of a solvent-based cellulose membrane passive sampling device for the monitoring of polar herbicides. *Chemosphere* 71:611–620. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.017

I

- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, *et al.* (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408:488–492. doi: 10.1038/35044114
- Imai T, Numachi K, Oizumi J, Sato S (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25:27-38

J

- Jacquet R, Miège C, Bados P, *et al.* (2012) Evaluating the polar organic chemical integrative sampler for the monitoring of beta-blockers and hormones in wastewater treatment plant effluents and receiving surface waters. *Environ Toxicol Chem* 31:279–288. doi: 10.1002/etc.737
- Jeffries V.E. (1982). Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29, p.201-226.

- Jenkins C, Hick P, Gabor M, *et al.* (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ* 105:109–126. doi: 10.3354/dao02623
- Jepson PD, Bennett PM, Deaville R, *et al.* (2005) Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem SETAC* 24:238–248.
- Jouaux A, Lafont M, Blin J-L, *et al.* (2013) Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* 14:590. doi: 10.1186/1471-2164-14-590

K

- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19:5720–5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720
- Kabeya Y, Kawamata T, Suzuki K, Ohsumi Y (2007) *Cis1/Atg31* is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 356:405–410. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.150
- Khakame SK, Wang X, Wu Y (2013) Baseline toxicity of metaflumizone and lack of cross resistance between indoxacarb and metaflumizone in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol* 106:1423–1429.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, *et al.* (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150:1507–1513.
- Kerby JL, Storfer A (2009) Combined effects of atrazine and chlorpyrifos on susceptibility of the tiger salamander to *Ambystoma tigrinum* virus. *EcoHealth* 6:91–98. doi: 10.1007/s10393-009-0234-0
- Kerr R, Robinson C, Essop FB, Krause A (2013) Genetic testing for Duchenne/Becker muscular dystrophy in Johannesburg, South Africa. *S Afr Med J* 103:999–1004.
- Kim J, Dalton VM, Eggerton KP, *et al.* (1999) Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol Biol Cell* 10:1337–1351.
- Kim J, Huang W-P, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem* 277:763–773. doi: 10.1074/jbc.M109134200

- Kim SY, Ko G (2012) Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus: Using propidium monoazide to assess viability. *Lett Appl Microbiol* 55:182–188. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03276.x
- Kim Y, Powell EN, Wade TL, Presley BJ (2008) Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar Environ Res* 65:101–127. doi: 10.1016/j.marenvres.2007.09.003
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, *et al.* (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147:435–446.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, *et al.* (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151:263–276.
- Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:931–937. doi: 10.1038/nrm2245
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118:7–18. doi: 10.1242/jcs.01620
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, *et al.* (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445–544.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, *et al.* (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151–175.
- Knauert S, Escher B, Singer H, *et al.* (2008) Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ Sci Technol* 42:6424–6430.
- Koner BC, Banerjee BD, Ray A (1998) Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J Exp Biol* 36:395–398.
- Kouassi, Edouard, Ayotte, Pierre, Roy, Raynald, *et al.* (2001) BISE | Effets des contaminants de l’environnement sur le système immunitaire. <http://www.inspq.qc.ca/bise/post/2001/04/20/Effets-des-contaminants-de-le28099environnement-sur-le-systeme-immunitaire.aspx#>. Accessed 28 Jan 2013.
- Koutros S, Berndt SI, Hughes Barry K, *et al.* (2013) Genetic susceptibility loci, pesticide exposure and prostate cancer risk. *PLoS ONE* 8:e58195. doi: 10.1371/journal.pone.0058195
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 277:18619–18625. doi: 10.1074/jbc.M111889200

- Kunz J, Henriquez R, Schneider U, *et al.* (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73:585–596.
- Kunz JB, Schwarz H, Mayer A (2004) Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem* 279:9987–9996. doi: 10.1074/jbc.M307905200
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, *et al.* (2009) Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol* 186:255–268. doi: 10.1083/jcb.200903070

L

- Labreuche Y, Soudant P, Gonçalves M, Lambert C, Nicolas J-L (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30:367-379
- Lacoste A, Malham S, Cueff A, Poulet S (2001) Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General & Comparative Endocrinology* 122:181-188
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F. (1997). *Biomarqueurs en .cotoxicologie – aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 419 p.
- Lambert C. (1998). Etude des infections à Vibrionaceae chez les mollusques bivalves, à partir d'un modèle larves de *Pecten maximus*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 182p.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V. et Corre S. (1998). *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, p.481-487.
- Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, *et al.* (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J* 17:3597–3607. doi: 10.1093/emboj/17.13.3597
- Lanyi K., Dinya Z. (2003) Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *Microchemical Journal* 75:1–13. doi: 10.1016/S0026-265X(03)00021-3
- Larson KG, Roberson BS, Hetrick FM (1989) Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of aquatic organisms* 6:131–136.
- Le Deuff R.M, Nicolas JL, Renault T & Cochenec N (1994). Experimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14(2), 69-72.

- Le Deuff RM, Renault T (1999) Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. J Gen Virol 80 (Pt 5):1317–1322.
- Le Foll F, Rioult D, Boussa S, et al. (2010) Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. Fish Shellfish Immunol 28:372–386. doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.011
- Le Roux D, Niedergang F (2010) [“Autophagy and microorganisms”: hotspots of a mini-symposium]. Médecine Sci MS 26:534–537. doi: 10.1051/medsci/2010265534
- Lee TG, Maruyama S (1998) Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. Biochem Biophys Res Commun 253:604–608. doi: 10.1006/bbrc.1998.9824
- Legakis JE, Yen W-L, Klionsky DJ (2007) A cycling protein complex required for selective autophagy. Autophagy 3:422–432.
- Levine B, Deretic V (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 7:767–777. doi: 10.1038/nri2161
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132:27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018
- Li CP, Prescott B, Eddy B, et al. (1965) Antiviral activity of paolins from clams. Ann N Y Acad Sci 130:374–382.
- Li CP, Prescott B, Eddy BE, et al. (1968) Studies on inhibition of viral oncogenesis. I. Reduced tumor incidence in hamsters inoculated with adenovirus 12 and treated with clam extracts. J Natl Cancer Inst 41:1249–1253.
- Li MF, Traxler GS (1972) Antiviral activity of aqueous clam (*Mya arenaria*) extract on amphibian virus (LT-1). Can J Microbiol 18:397–402.
- Liang C (2011) Herpesviral Interaction with Autophagy. J Bacteriol Virol 41:213. doi: 10.4167/jbv.2011.41.4.213
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 402:672–676. doi: 10.1038/45257
- Lightner D.V. et Redman R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp in northwestern Peru. Aquaculture 122, p.9-18.
- Lightner D.V. et Redman R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164, p.201-220.
- Limasset, P. (1961). Preliminary observations demonstrating the existence of tobacco mosaic virus inhibitors in aquatic animals, mostly marine. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 252: 3154-

- Lin W-T, Luo J-F, Guo Y (2011) Comparison and characterization of microbial communities in sulfide-rich wastewater with and without propidium monoazide treatment. *Curr Microbiol* 62:374–381. doi: 10.1007/s00284-010-9716-0
- Lindmo K, Stenmark H (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119:605–614. doi: 10.1242/jcs.02855
- Liu PC, Chen YC, Lee KK (2001) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104:71–77.
- Liu S-Q, Liu S-X, Fu Y-X (2008) Molecular motions of human HIV-1 gp120 envelope glycoproteins. *J Mol Model* 14:857–870. doi: 10.1007/s00894-008-0327-7
- Lorteau, C., Auffret, M. & Le Bris, H. (1995). Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves. I. Structure et fonctionnement. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 171: 415-422.
- Luna-Acosta A, Renault T, Thomas-Guyon H, *et al.* (2012) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere* 87:1335–1340. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, *et al.* (2003) Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 15:275–282.

M

- Majeski AE, Dice JF (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2435–2444. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.013
- Malham SK, Lacoste A, Gélébart F, *et al.* (2003) Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 295:136–144. doi: 10.1002/jez.a.10222
- Masuda M, Satsuma K, Sato K (2012) An environmental fate study of methoxychlor using water-sediment model system. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:73–77.
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192:245–250.
- Maurer, D. & Borel, M. (1986). Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des Huîtres .g.es de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15: 125-134.
- McCormick-Ray, M.G. & Howard, T. (1991). Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 219-230.

- Menin A, Ballarin L, Bragadin M, Cima F (2008) Immunotoxicity in ascidians: antifouling compounds alternative to organotins - II. The case of Diuron and TCMS pyridine. *J Environ Sci Health B* 43:644–654. doi: 10.1080/03601230802352690
- Mills NJ (2008) Metaldehyde poisoning of dogs. *Vet Rec* 163:310.
- Mix, M.C. (1976). A general model for leucocyte cell renewal in bivalve molluscs. *Marine Fisheries Review*: 37-41.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, *et al.* (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116:1679–1688.
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273:33889–33892.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, *et al.* (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152:657–668.
- Montes J, Durfort M, García-Valero J (1995) Cellular defence mechanism of the clam, *Tapes semidecussatus*, against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell and Tissue Research* 279:529-538
- Moore, C.A. & Gelder, S.R. (1985). Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). *Transactions of the American Microscopy Society* 104: 242-249.
- Moore, M.N. (2002). Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 59: 1-15.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Paul Leonard, D.R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 247-268.
- Moore MN (2008) Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 4:254–256.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol Amst Neth* 84:80–91. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.06.007
- Moreau P, Burgeot T, Renault T (2014) Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term in vitro assays. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:4940–4949. doi: 10.1007/s11356-013-1931-3

- Moreau P, Burgeot T, Renault T (2014) In vivo effects of metaldehyde on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: comparing hemocyte parameters in two oyster families. Environ Sci Pollut Res Int. doi: 10.1007/s11356-014-3162-7
- Mori, K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biology 53: 361-369.
- Mortimore GE, Schworer CM (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. Nature 270:174–176.
- Munaron L (2006) Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. Recent Pat Anticancer Drug Discov 1:105–119.
- Munaron D, Dubernet JF, Delmas F, et al. (2006) Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay.

N

- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. Science 306:1037–1040. doi: 10.1126/science.1103966
- Neumann N, Stafford J, Barreda D, Ainsworth A, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Developmental & Comparative Immunology 25:807-825
- Neuwoehner J, Zilberman T, Fenner K, Escher BI (2010) QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. Aquat Toxicol 97:58–67. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.005
- Nicolas JL, Comps M, Cochennec N (1992) Herpes-like virus infecting pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.
- Nicolas J.L., Basuyaux O., Mazurié J. et Thébault A. (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. Diseases of Aquatic Organisms 50, p.35-43.
- Nielsen, James W (1988). « Method and composition for killing terrestrial molluscs. » U.S. Patent No. 4,765,979.23 Aug.
- Noda T, Kim J, Huang WP, et al. (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. J Cell Biol 148:465–480.

O

- OFIMER (2008). Key figures for the fisheries and aquaculture sector in France. Paris.
- Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, *et al.* (2005) Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307:727–731. doi: 10.1126/science.1106036
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:211–216. doi: 10.1038/35056522
- Olafsen J.A., Mikkelsen H.V., Giæver H.M. et Høvik Hansen G. (1993). Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, p.1848-1854.
- Olicard C, Renault T, Torhy C, *et al.* (2005) Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 66:147–152. doi: 10.1016/j.antiviral.2005.03.003
- Ordás MC, Ordás A, Beloso C, Figueras A (2000) Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol* 10:597–609. doi: 10.1006/fsim.2000.0274
- Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, *et al.* (2007) HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1:23–35. doi: 10.1016/j.chom.2006.12.001
- Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, *et al.* (2010) Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* 7:115–127. doi: 10.1016/j.chom.2010.01.007

P

- Paillard C., Gausson S., Nicolas J.L., le Pennec J.P. et Haras D. (2006). Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, p.25-38.
- Pampanin, D.M., Marin, M.G. & Ballarin, L. (2002). Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the Venus clam *Chamelea gallina*. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 227-234.
- Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD (1997) Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J Biol Chem* 272:2477–2485.

- Parshionikar S, Laseke I, Fout GS (2010) Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl Environ Microbiol* 76:4318–4326. doi: 10.1128/AEM.02800-09
- Patetsini E, Dimitriadis VK, Kaloyianni M (2013) Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquatic Toxicology* 126:338–345. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.09.009
- Pepin JF, Riou A, Renault T (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 149:269–276. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.022
- Perdue J.A., Beattie J.H., Chew K.K. (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. par Perdue J. A., Beattie J. H. & Chew K. K.,: 1981 - NATURAMA. *J Shellfish Res* 1:9–16.
- Pesce S, Lissalde S, Lavieille D, et al. (2010) Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquat Toxicol* 99:492–499. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.06.006
- Pfeifer U (1977) Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. *Acta Biol Med Ger* 36:1691–1694.
- Picard C, Casanova J-L, Abel L (2006) Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol* 18:383–390. doi: 10.1016/j.coi.2006.05.005
- Pichot Y, Comps M, Tige G, Grizel H, & Rabouin M-A (1980). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. N., sp N., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 43: 131-140.
- Pipe, R.K. (1990a). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal* 22: 595-603.
- Pipe, R.K. (1990b). Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* 261: 261-268.
- Prescott B, Li CP, Caldes G, Martino EC (1966) Chemical studies of paolin. II. An antiviral substance from oysters. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 123:460–464.

R

- Ramu K, Kajiwaru N, Isobe T, *et al.* (2007) Spatial distribution and accumulation of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in blue mussels (*Mytilus edulis*) from coastal waters of Korea. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 148:562–569. doi: 10.1016/j.envpol.2006.11.034
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, *et al.* (2010) Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 90:1383–1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009
- Reggiori F, Klionsky DJ (2006) Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119:2903–2911. doi: 10.1242/jcs.03047
- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 6:79–90.
- Rehman H, Mohan A, Tabassum H, *et al.* (2011) Deltamethrin Increases *Candida albicans* infection susceptibility in mice. *Scand J Immunol* 73:459–464. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02521.x
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N & Maffart P (1994a) Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue Med Vet* 145:735-742
- Renault T, Cochenne N, Le Deuff RM & Chollet B (1994b) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14 (2):64-66
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, *et al.* (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res* 26:539–543.
- Renault T & Lipart C (1998). Diagnostic of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. *European Aquaculture Society, Special Issue* 26: 235-236
- Renault T (1998) Infections herpétiques chez les invertébrés: détection de virus de type Herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virologie*, 2(5), 401-402.
- Renault T, Le Deuff RM, Chollet B, *et al.* (2000) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Organ* 42:173–183. doi: 10.3354/dao042173

- Renault T, Lipart C, Arzul I (2001) A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis Aquat Organ* 45:1–7. doi: 10.3354/dao045001
- Renault, T. (2011). Les virus infectant les mollusques marins: un exemple d'actualité, les herpèsvirus. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 164(4), 359-364.
- Renault T (2011) Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know? *Pestic. Mod. World - Risks Benefits*
- Renault T, Faury N, Barbosa-Solomieu V, Moreau K (2011) Suppression substractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev Comp Immunol* 35:725–735. doi: 10.1016/j.dci.2011.02.004
- Renault T, Moreau P, Faury N, *et al.* (2012) Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 86:5942–5947. doi: 10.1128/JVI.06534-11
- Repamo (2012) Bilan 2012 du réseau Repamo.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00143/25470/23625.pdf>
- Repamo (2013) Bilan 2013 du réseau Repamo.
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00197/30798/29167.pdf>
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, *et al.* (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17:205–215. doi: 10.1002/rmv.531
- Rohr JR, Raffel TR, Halstead NT, *et al.* (2013) Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. *Proc Biol Sci* 280:20131502.
- Roizman B & Furlong D (1974). The replication of herpesvirus. In: *Comprehensive Virology*, vol 3 (edition H Fraenkel-Conrat and RR Wagner), 29-403. Plenum Press, New York.
- Ross MW (1996) Managing HIV. Part 3: Mechanisms of disease. 3.8 How psychosocial aspects of HIV infection can affect health. *Med J Aust* 164:235–237.
- Rostagno B, Violleau A, Brun C, Dietrich P, Fillon A, Goulletquer P, Guichet R, Kantin R, Legay D, Loubersac L, Masson D, Rocher G, Ryckaert M, Thomas G, Fichet D, Guyot D, Miramand P, Pigeot J, Seguignes M & Taillade, S. (1999). *Qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais - Bilan et diagnostic*, 130 p.
- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11:709–730. doi: 10.1038/nrd3802
- Russo J, Lagadic L (2004) Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut* 127:303–311.

S

- Saglio P, Bretau S, Rivot E, Olsén KH (2003) Chemobehavioral Changes Induced by Short-Term Exposures to Prochloraz, Nicosulfuron, and Carbofuran in Goldfish. Arch Environ Contam Toxicol 45:515–524. doi: 10.1007/s00244-003-2223-6
- Saitoh T, Akira S (2010) Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. The Journal of Cell Biology 189:925–935. doi: 10.1083/jcb.201002021
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. J Microbiol Methods 77:191–197. doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.021
- Saulnier D, Decker S, Haffner P, *et al.* (2010) A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity. Microb Ecol 59:787–798. doi: 10.1007/s00248-009-9620-y
- Sauvage C, Pepin JF, Lapègue L, Boudry B, Renault T (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. 142 (1-2): 181-187.
- Savage C, Thrush SF, Lohrer AM, Hewitt JE (2012) Ecosystem services transcend boundaries: estuaries provide resource subsidies and influence functional diversity in coastal benthic communities. PloS One 7:e42708. doi: 10.1371/journal.pone.0042708
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, *et al.* (2011a) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. Virus Res 155:28–34. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.031
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, *et al.* (2011b) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Vet Res 42:27. doi: 10.1186/1297-9716-42-27
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, *et al.* (2011c) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Vet Res 42:27. doi: 10.1186/1297-9716-42-27
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. Dev Cell 7:167–178. doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.009
- Segarra A, Mauduit F, Faury N, *et al.* (2014) Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. BMC Genomics 15:580. doi: 10.1186/1471-2164-15-580

- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, *et al.* (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153:92–99. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Seglen PO, Gordon PB (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:1889–1892.
- Shahnazari S, Yen W-L, Birmingham CL, *et al.* (2010) A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* 8:137–146. doi: 10.1016/j.chom.2010.07.002
- Shaw PL, Kirschner AN, Jardetzky TS, Longnecker R (2010) Characteristics of Epstein-Barr virus envelope protein gp42. *Virus Genes* 40:307–319. doi: 10.1007/s11262-010-0455-x
- Shi C-S, Kehrl JH (2008) MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem* 283:33175–33182. doi: 10.1074/jbc.M804478200
- Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, *et al.* (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* 18:5234–5241. doi: 10.1093/emboj/18.19.5234
- Smolowitz R, Leavitt D, Perkins F (1998) Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (hard clams) from the coast of Massachusetts. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:9-25
- Snieszko SF (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *J Fish Biol* 6:197–208. doi: 10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x
- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R., Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D. and Goulletquer, P. (1998) Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. 386: 131-146.
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, *et al.* (2003) Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol Ecol* 45:1–11. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00127-2
- Sparks, A.K. & Morado, J.F. (1988). Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 139-152.
- Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* 12:2195–2204.

- Stanojlović O, Nikolić T, Hrnčić D, *et al.* (2013) Ontogenetic influence on rat susceptibility to lindane seizure after pretreatment with phencyclidine. *Environ Toxicol Pharmacol* 35:161–170. doi: 10.1016/j.etap.2012.12.006
- Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D. et Muroga K. (1998). *Vibrio splendidus* biovar I1 as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, p.111-118.
- Sumpter R, Levine B (2010) Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol* 21:699–711. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.04.003
- Sunila, I. and LaBanca, J. (2003) Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases Of Aquatic Organisms* 56(2), 163-170.
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, *et al.* (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20:5971–5981. doi: 10.1093/emboj/20.21.5971

T

- Takahashi K.G., Nakamura A. et Mori K. (2000). Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 75, p.212-7.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301-311.
- Tanguy A, Guo X, Ford S (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern *Crassostrea virginica* and Pacific *C. gigas* oysters. *Gene* 338:121-131
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J* 272:390–403. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04479.x
- Taskin B, Gozen AG, Duran M (2011) Selective Quantification of Viable *Escherichia coli* Bacteria in Biosolids by Quantitative PCR with Propidium Monoazide Modification. *Appl Environ Microbiol* 77:4329–4335. doi: 10.1128/AEM.02895-10
- Tasumi, S. & Vasta, G.R (2007) A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol* 179(5), 3086-98.
- Tawde SN, Puschner B, Albin T, et al. (2012) Death by caffeine: presumptive malicious poisoning of a dog by incorporation in ground meat. *J Med Toxicol* 8:436–440. doi: 10.1007/s13181-012-0254-y

- Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, *et al.* (2009) Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev Comp Immunol* 33:653–659. doi: 10.1016/j.dci.2008.11.011
- Thomson, J.D., Pirie, B.J.S. & George, S.G. (1985). Cellular metal distribution in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thun.) determined by quantitative X-ray microprobe analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 85: 37-45.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. and Roch, P. (1997) Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galoprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 21, 267-275.
- Travers M-A, Le Bouffant R, Friedman CS, *et al.* (2009) Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J Cell Biochem* 106:152–160. doi: 10.1002/jcb.21990
- Triebkorn R, Henderson I,F, Martin A, Kolher HR (1996). Slugs as target or non-target organisms for environmental chemicals. In: *Slugs and Snail Pests in Agriculture*, ed, Henderson, I.F. BCPC Monograph No 66: 65-72
- Tubiash H.S., Chanley P.E. et Leifson E. (1965). Bacillary Necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology* 90, p.1036-1044.
- Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA, Klionsky DJ (2003) Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J Biol Chem* 278:48445–48452. doi: 10.1074/jbc.M309238200

V

- Van Banning P (1991) Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93:205–211. doi: 10.1016/0044-8486(91)90232-V
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Van Loveren H, Ross PS, Osterhaus AD, Vos JG (2000) Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicol Lett* 112-113:319–324.
- Vargha M, Takáts Z, Márialigeti K (2005) Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. *Water Res* 39:1560–1568. doi: 10.1016/j.watres.2004.10.013
- Vial T, Nicolas B, Descotes J (1996) Clinical immunotoxicity of pesticides. *J Toxicol Environ Health* 48:215–229. doi: 10.1080/009841096161294

Von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al. (2008) Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science* 321:691–696. doi: 10.1126/science.1158298

W

Wang Y.B., Li J.R. et Lin J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, p.1-4.

Wang Z-X, Zhou X-Z, Meng H-M, et al. (2014) Comparative transcriptomic analysis of the heat stress response in the filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* using RNA-Seq. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5589–5597. doi: 10.1007/s00253-014-5763-y

Wang H, Cao X, Lin Z, et al. (2014) Exome Sequencing Reveals Mutation in GJA1 as a Cause of Keratoderma-Hypotrichosis-Leukonychia Totalis Syndrome. *Hum Mol Genet.* doi: 10.1093/hmg/ddu442

Webb, S. C., Fidler, A., & Renault, T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272(1), 126-139.

Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625.

White E (2008) Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis. *Autophagy* 4:399–401.

Wong, Steve, *et al.* (1992) "Environmental immunotoxicology." *Animal biomarkers as pollution indicators*. Springer Netherlands. 167-189.

Wootton, E.C., Dyrinda, E.A. & Ratcliffe, N.A. (2003). Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology* 15: 195-210.

X

Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9:1102–1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102

Xu Y, Jagannath C, Liu X-D, *et al.* (2007) Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27:135–144. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.022

Xu Y, Xiao B, Jiang W-T, et al. (2014) A novel mutation identified in PKHD1 by targeted exome sequencing: guiding prenatal diagnosis for an ARPKD family. *Gene.* doi: 10.1016/j.gene.2014.08.032

- Xue, Q. (1998). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 324 p.
- Xue, Q. & Renault, T. (2000). Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 155-63.
- Xue, Q., Renault, T., Cochenne, N. & Gerard, A. (2000). Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte subpopulations. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 155-65.
- Xue, Q. & Renault, T. (2001). Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 187-194.
- Xue, Q.G., Renault, T. & Chilmonczyk, S. (2001). Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 557-567.

Y

- Yen W-L, Legakis JE, Nair U, Klionsky DJ (2007) Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Biol Cell* 18:581–593. doi: 10.1091/mbc.E06-07-0612
- Yin L, Lu L, Prasad K, *et al.* (2011) Genetic-based, differential susceptibility to paraquat neurotoxicity in mice. *Neurotoxicol Teratol* 33:415–421. doi: 10.1016/j.ntt.2011.02.012
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1542–1552. doi: 10.1038/sj.cdd.4401765
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 271:13854-13860
- Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, *et al.* (2009) *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* 11:1233–1240. doi: 10.1038/ncb1967

Z

- Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, *et al.* (2007) TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317:1522–1527. doi: 10.1126/science.1139522
- Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54. doi: 10.1038/nature11413
- Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, *et al.* (2009) The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950 183:5909–5916. doi: 10.4049/jimmunol.0900441

Annexes

Articles

Article n°5

Journal of Virology

May 2012 vol. 86 (10), Pages 5942-5947

<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06534-11>

© 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Archimer

<http://archimer.ifremer.fr>

Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas

Tristan Renault^{a,*}, Pierrick Moreau^a, Nicole Faury^a, Jean-François Pepin^a, Amélie Segarra^a
and Stephen Webb^b

^a Ifremer (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer), Laboratoire de Génétique et de Pathologie, Ronces les Bains, La Tremblade, France

^b Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

*: Corresponding author : Tristan Renault, Tel. : 33 5 46 76 26 26 ; Fax: 33 5 46 76 26 11
email address : Tristan.Renault@ifremer

Abstract:

Although there are a number of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) variants, it is expected that the true diversity of this virus will be known only after the analysis of significantly more data. To this end, we analyzed 72 OsHV-1 "specimens" collected mainly in France over an 18-year period, from 1993 to 2010. Additional samples were also collected in Ireland, the United States, China, Japan, and New Zealand. Three virus genome regions (open reading frame 4 [ORF4], ORF35, -36, -37, and -38, and ORF42 and -43) were selected for PCR analysis and sequencing. Although ORF4 appeared to be the most polymorphic genome area, distinguishing several genogroups, ORF35, -36, -37, and -38 and ORF42 and -43 also showed variations useful in grouping subpopulations of this virus.

Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) has been classified within the *Malacoherpesviridae* family (6, 7, 12). Although OsHV-1 variants have already been reported (2, 3, 13, 19, 20), more work is needed to gauge the range of OsHV-1 polymorphisms. Since 2008, massive mortality outbreaks among Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) have been reported in Europe (8, 21) associated with a virus genotype labelled μ Var (22). In addition, mortality outbreaks were reported recently in New Zealand and Australia (15, 16) in association with a virus interpreted as OsHV-1 μ Var. Moreover, a herpesvirus with close affinities to OsHV-1, the acute viral necrosis virus (AVNV), infecting Chinese cultured scallops *Chlamys farreri*, has been recently sequenced (GenBank accession n° GQ153938). Comparative genomic analysis between AVNV and OsHV-1 suggests that AVNV is a variant of OsHV-1 (Ren Weicheng, pers. com.).

Seventy-two samples of Pacific oysters collected from 1993 to 2010 and covering different stages of development (larvae, spat and adults) (Table 1) were selected. Most of the samples (a total of 63) were collected in France during episodes of mortality and were stored frozen at -20°C. Nine samples came from elsewhere (Ireland, China, Japan, USA and New Zealand) and included three paraffin-embedded archival specimens (Table 1). Nucleic acid extraction was performed by using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's handbook (17). For frozen tissues, 60-200 mg of larvae or 20-60 mg of mantle from juveniles and adults were used. For paraffin-embedded specimens (spat collected in 2005 during mortality events in New Zealand), five sections each of 30 μ m thickness were cut from each histology block (1, 4, 23).

PCR assays were performed using 3 extant primer pairs targeting 3 virus genome regions: C2/C6 (ORF4) (18), IA2/IA1 (ORFs 42/43) (22) and Del 36-37F2/Del 36-37R (5'-

59 ATACGATGCGTCGGTAGAGC-3'/5'-CGAGAACCCCATTCCTGTAA-3') (ORFs
 60 35/36/37/38) (Fig. 1). All tested samples yielded amplicons of expected sizes with primer
 61 pairs C2/C6 (709bp) and IA1/IA2 (607bp) except for one specimen, perhaps due to
 62 limiting template.(Fig. 2A). For the Del 36-37F2/Del 36-37R primer pair, DNA samples
 63 each gave 1 of 3 different patterns: a PCR product of expected size (989 bp), a PCR
 64 product of 384 bp, or no amplification (Fig. 2A). Twenty-eight French samples collected
 65 from 1993 to 2008 yielded 989 bp amplicons and might be interpreted as the reference
 66 type (accession n° AY509253), a virus isolated from French Pacific oyster larvae in 1995
 67 (6). A large deletion (605 bp) was reported for all samples identified as being the variant
 68 OsHV-1 μ Var (7 French samples collected in 2008, 13 French samples in 2009 and 2010
 69 and a sample collected in Ireland in 2009), and also for samples collected in China, USA,
 70 Japan and New Zealand. Finally, a third group of virus specimens (from French oysters
 71 collected in 1993 and from 2003 to 2008) was defined based on the absence of
 72 amplification. This lack of amplification was not related to the absence of virus DNA, as
 73 amplicons were obtained from the same samples with the primer pairs C2/C6 and
 74 IA1/IA2 (Fig. 2A). The 605 bp deletion reported for OsHV-1 μ Var and related specimens
 75 covered entirely both ORF36 and ORF37 and a part of ORF38 (Fig. 1). This deletion of 2
 76 genes and the modification of a third might be more than coincidental with the apparently
 77 increased virulence of OsHV-1 μ Var. ORF38 encodes a RING finger protein. The RING
 78 finger domain of ICP0 and homologs from alphaherpesviruses is required for the
 79 activation of quiescent genomes (5, 9, 10, 11, 14). Modifications of the RING finger
 80 protein encoded by ORF38 might affect its activities and influence OsHV-1 virulence.

81 For DNA samples extracted from paraffin-embedded specimens, PCR analyses were
82 carried out using primer pairs C9/C10 (5'-GAGGGAAATTTGCGAGAGAA-3'/5'-
83 ATCACCGGCAGACGTAGG-3'), CF/CR (5'-CCCCGGGGAAAAAGTATAAA-3'/5'-
84 GTGATGGCTTTGGTCAAGGT-3') and Del 36-37F2/Del 36-37R (see above). C9/C10
85 and CF/CR primers targeted ORF4. Two histological blocks from the 3 analysed samples
86 yielded amplicons with the 3 primer pairs used (Fig. 2B). For CF/CR primers, the 2
87 samples yielded a 157 bp amplicon similar in size to that obtained for OsHV-1 μ Var (Fig.
88 2B). The specimen considered as the reference type (1995/020/France) gave a 173 bp
89 product. For Del 36-37F2/Del 36-37R primer, a 384 bp amplicon was obtained for the 2
90 samples from New Zealand (Fig. 2B) although the specimen 1995/020/France (reference
91 type) yielded a 989 bp product. The obtained PCR product sizes suggest that the variant
92 OsHV-1 μ Var or a related virus was present in Pacific oysters collected in New Zealand
93 in 2005. Moreover, C9/C10 PCR products from a paraffin-embedded specimen appeared
94 identical in sequence to OsHV-1 μ Var presenting a single deletion in comparison with
95 the sequence of OsHV-1 (accession n° AY509253) (data not shown).

96 PCR products were purified by kit (Amicon Ultra 0.5 ml 30K Centrifugal filter,
97 Millipore) according to the supplied protocol and were then directly sequenced. Samples
98 were loaded into ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer. Phylogenetic
99 analyses were performed on sequence concatenations of the 3 genome areas (1426
100 positions) using the Maximum Likelihood method with the program MEGA5 (24). Partial
101 PCR product sequences from virus specimens were submitted to GenBank (Table 1).

102 IA1/IA2 amplicon sequences (ORFs 42/43) were compared to OsHV-1 (accession n°
103 AY509253) using the ClustalW program. Two mutations were observed differentiating

104 samples in 3 groups: the first one containing samples presenting 100% identities with
105 OsHV-1 (accession n° AY509253, reference type), the second presenting 100% identities
106 with OsHV-1 μ Var (22) and the third group contained both samples collected in New
107 Zealand in 2010 presenting only one of the mutations characterizing OsHV-1 μ Var, an A
108 deletion (22).

109 For Del 36-37F2/Del 36-37R, amplicons from samples collected in France in 2009 and
110 2010, some of the samples collected in 2008 and samples collected in China, USA, Japan
111 and New Zealand demonstrated a 605 bp deletion. Although amplicons obtained from
112 samples collected in France from 1993 to 2007 and some of the samples collected in 2008
113 did not demonstrate the 605 bp deletion, a few point mutations were reported
114 differentiating 3 groups, one of these groups presenting 100% identity with the reference
115 type (accession n° AY509253).

116 Finally, C2/C6 amplicons demonstrated the highest polymorphism with 82 positions of a
117 460 nucleotide sequence showing mutations defining at least 19 virus groups. All the
118 French samples collected in 2009 and 2010 showed 100% identities with the OsHV-1
119 μ Var sequence (accession n° HQ842610) except for 2 virus specimens (2010/02/France
120 and 2010/12/France). Although most of the French samples collected until 2007 were
121 similar to the reference type (accession n° AY509253), some of them demonstrated
122 mutations in comparison with this reference. Thus, polymorphisms for several
123 microsatellite zones with variable numbers of repetitions were observed: 5-9 A, 5-6 G, 4-
124 5 C and 4-13 CTA with 3 repetitions for AVNV, 4 for OsHV-1 μ Var and 8 for the
125 reference type (data not shown). For this microsatellite zone, some virus specimens
126 collected in France showed also 9, 11 or 13 repetitions.

127 Phylogenetic analysis allowed identification of 2 main groups from 54 virus specimens
128 (Fig. 3). A first group contained French specimens collected from 1994 to 2008 including
129 the reference type (accession n° AY509253). This group also integrated samples
130 collected in USA and in China, and AVNV (Fig. 3). The second main group was
131 composed of French specimens collected from 2008 to 2010 and an isolate collected in
132 Ireland in 2009. The sequence of OsHV-1 μ Var deposited in GenBank (accession n°
133 HQ842610) was included in this group. It also integrated samples from Japan and New
134 Zealand (Fig. 3). Although the C2/C6 fragment sequence for these specimens (Japan and
135 New Zealand) was similar to OsHV-1 μ Var sequence (accession n° HQ842610), they
136 differed from HQ842610 by two shared mutations (two A replaced by two G).

137 Several French samples collected from 1993 to 2008 demonstrated 100% identities with
138 the reference type and as such could be identified as OsHV-1 (6). Other samples collected
139 in France from 2003 to 2008 showed some differences in comparison with the reference
140 type. Although they appeared closely related to this virus type (accession n° AY509253)
141 for ORF4, these samples did not yield amplicons when the Del 36-37F2/Del 36-37R
142 primer pair was used. These results suggest that different OsHV-1 variants coexisted in
143 France before 2008. The variant OsHV-1 μ Var was not detected in French samples
144 collected before 2008 in the present study. These results are in accordance with those
145 reported by Segarra et al. (2010), who concluded that OsHV-1 μ Var was not detected in
146 archival samples and that, in Europe, OsHV-1 μ Var was an emerging genotype.

147 Phylogenetic analysis suggested also that although the reference type and OsHV-1 μ Var
148 share a common ancestor (Fig. 3), OsHV-1 μ Var is not directly derived from the
149 reference type. Moreover, 3 different types were detected in 2008 in France: specimens

150 identical to the reference type, viruses related to the reference type (closely related by the
151 ORF4, but not amplified with Del 36-37F2/Del 36-37R primer pair) and specimens
152 identical to OsHV-1 μ Var. Finally, 2 French virus specimens collected in 1993 presented
153 high homologies with the variant OsHV-1 Var (3). This variant was reported in 1997
154 during a mortality outbreak affecting both larval Pacific oysters and larval Manila clams,
155 *Ruditapes philippinarum*, in a commercial hatchery (19, 20). Both French samples from
156 1993 correspond to *C. gigas* larvae collected in a commercial hatchery. It is thus possible
157 that intensive farming conditions under which different bivalve species are kept at the
158 same time in close proximity might promote interspecies transmission (2, 3).

159 The sample collected in California demonstrated the 605 bp deletion observed in the
160 ORFs 35/36/37/38 area for OsHV-1 μ Var. However, it did not present the mutations
161 characterising this variant within the ORF4 and it appeared identical to OsHV-1 for the
162 ORFs 42/43 area. AVNV grouped with the isolate collected in California based on
163 sequence data obtained in the present study (Fig. 3). Although AVNV presents variations
164 in coding and non-coding regions in comparison to OsHV-1, these results suggest
165 strongly that AVNV is an OsHV-1 variant.

166 ORF4 appeared as the most polymorphic genome area distinguishing several genogroups.
167 However, ORFs 35/36/37/38 and ORFs 42/43 areas also showed variations useful in
168 defining different genotypes.

169

170 The authors thank C. Friedman, C. Burge, K. S. Reece and D. Cheslett for providing
171 DNA samples from USA, China and Ireland.

172

173 *References*

- 174 1. An, S. F., and K. A., Fleming. 1991. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain
175 reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. *J. Clin. Pathol.*
176 44:924-927.
- 177 2. Arzul, I., J.-L., Nicolas, A. J., Davison, and T., Renault. 2001. French scallops: a
178 new host for ostreid herpesvirus1. *Virology* 290(2):342-349.
- 179 3. Arzul, I., T., Renault, C., Lipart, and A. J., Davison. 2001. Evidence for
180 interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.*
181 82:865-870.
- 182 4. Coates, P. J., A. J., D'Ardennes, G., Khan, H. O., Kangero, and G., Slavin. 1991.
183 Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely
184 fixed paraffin wax section. *J. Clin. Pathol.* 44:115-118.
- 185 5. Cohen, J. I., and H., Nguyen. 1998. Varicella-Zoster virus ORF61 deletion mutants
186 replicate in cell culture, but a mutant with stop codons in ORF61 reverts to wild-
187 type virus. *Virology*, 246:306-316.
- 188 6. Davison, A. J., B. L., Trus, N., Cheng, A. C., Steven, M. S., Watson, C.,
189 Cunningham, R.-M., Le Deuff, and T., Renault. 2005. A novel class of
190 herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86:41-53.
- 191 7. Davison, A. J., R., Eberle, B., Ehlers, G. S., Hayard, D. J., McGeoch, A. M.,
192 Minson, P. E., Pellett, B., Roizman, M. J., Studdert, and E., Thiry. 2009. The
193 order *Herpesvirales*. *Arch Virol.* 154: 171-177.
- 194 8. EFSA. 2010. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a
195 request from the European Commission on the increased mortality events in

- 196 Pacific oysters *Crassostrea gigas*. EFSA J. 8(11):1894-1853.
- 197 9. Everett, R. D., C., Boutell, C., McNair, L., Grant, and A., Orr. 2010. Comparison
198 of the biological activities of several members of the alphaherpesvirus ICP0
199 family proteins. J. Virol. 84(7):3476-3487.
- 200 10. Ferenczy, M. W., D. J., Ranayhossaini, and N. A., Deluca. 2011. Activities of
201 ICP0 involved in the reversal of silencing of quiescent herpes simplex virus 1. J.
202 Virol. 85(10):4993-5002.
- 203 11. Gu, H., and B., Roizman. 2009. The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0,
204 inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of
205 PML, are executed in tandem. J. Virol. 83(1):181-187.
- 206 12. Le Deuff, R.-M., and T., Renault. 1999. Purification and partial genome
207 characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea*
208 *gigas*. J. Gen. Virol. 80:1317-1322.
- 209 13. Moss, J.A., E. M., Burrenson, J. F., Cordes, C. F., Cungan, G. D., Brown, A.,
210 Wang, X., Wu, and K. S., Reece. 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and
211 other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction in
212 Chesapeake Bay. Dis. Aquat. Org. 77:207-233.
- 213 14. Moriuchi, H., M., Moriuchi, and J. I., Cohen. 1994. The RING finger domain of
214 the Varicella-Zoster virus open reading frame 61 protein is required for its
215 transregulatory functions. Virology. 205:238-246.
- 216 15. OIE. 2011. Ostreid herpesvirus- μ variant, Australia,
217 http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=10235
- 218 16. OIE. 2011. Ostreid herpesvirus-1, New Zealand,

- 219 http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=1023
- 220 17. Qiagen. 2007. QIAmp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Second Edition
- 221 November 2007.
- 222 18. Renault, T., and I., Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared
- 223 bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. J. Fish Dis.
- 224 24:161-167.
- 225 19. Renault, T., C., Lipart, and I., Arzul. 2001. A herpes-like virus infecting
- 226 *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. J. Fish Dis.
- 227 24:369-376.
- 228 20. Renault, T., C., Lipart, and I., Arzul. 2001. A herpes-like virus infects a non-
- 229 ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. Dis.
- 230 Aqua. Org. 45:1-7.
- 231 21. Schikorski, D., T., Renault, D., Saulnier, N., Faury, P., Moreau, and J.-F., Pepin.
- 232 2011. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid
- 233 herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. Vet. Res. 42:27-40.
- 234 22. Segarra, A., J.-F., Pepin, I., Arzul, B., Morga, N., Faury, and T., Renault. 2010.
- 235 Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype
- 236 associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*.
- 237 Vir. Res. 153:92-95.
- 238 23. Shibata, D. 1994. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by
- 239 polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. Hum. Pathol. 21:561-
- 240 563.
- 241 24. Tamura, K., D., Peterson, N., Peterson, G., Stecher, M., Nei, and S., Kumar.

242 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum
243 Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol.
244 Evol. doi: 10.1093/molbev/msr121.

245 *Figure legends*

246 Figure 1. Scale diagram of ORFs 35, 36, 37 and 38 for the OsHV-1 reference (A) and
 247 virus specimens presenting a 605 bp deletion (B) area. The vertical lines indicate
 248 the limits of the different ORFs. The deleted sequence is located between the
 249 dashed arrows: ORFs 36 and 37 are totally missing, as is a part of ORF38.

250 Figure 2A. PCR products (Del 36-37F2/Del 36-37R, C2/C6 and IA1/IA2) from selected
 251 virus specimens electrophoresed on 1.5% agarose. M: Small Marker (Eurogentec),
 252 1: 1993/012/France, 2: 1994/005/France, 3: 1995/020/France, 4: 2005/012/France,
 253 5: 2006/005/France, 6: 2007/004/France, 7: 2008/020/France, 8: 1993/002/France,
 254 9: 2005/005/France, 10: 2006/009/France, 11: 2006/013/France, 12:
 255 2007/028/France, 13: 2008/019/France, 14: 2008/073/France, 15:
 256 2008/011/France, 16: 2010/001/New Zealand, 17: 2010/158 144/Japan, 18:
 257 2009/002/France, 19: 2009/022/France, 20: 2010/002/France, 21: 2010/021/France
 258 and N: negative control.

259 Figure 2B. PCR analysis of the DNA samples extracted from histological blocks (Pacific
 260 oysters collected in 2005 in New Zealand during a mortality outbreak). M: Small
 261 Marker (Eurogentec), 1: 2005/2E/New Zealand, 2: 2005/2H/New Zealand, 3:
 262 1995/020/France (OsHV-1 reference), 4: 2008/055/France (OsHV-1 μ Var) and N:
 263 Negative control.

264 Figure 3. Phylogenetic tree generated by the Maximum Likelihood method. Bootstrap
 265 values were obtained from 1 000 resampled datasets. The analysis involved 54
 266 nucleotide sequences (C2/C6, Del 36-37F2/Del 36-37R and IA1/IA2 concatenated
 267 PCR products). There were a total of 1426 positions in the final dataset. OsHV-1

268 (reference type) and AVNV were also included for phylogenetic analysis.

269 *Table*

270

271 Table 1. List of samples: DNA extracted from *C. gigas*, geographical origins, year of
272 sampling, stage of development and GenBank accession numbers

273

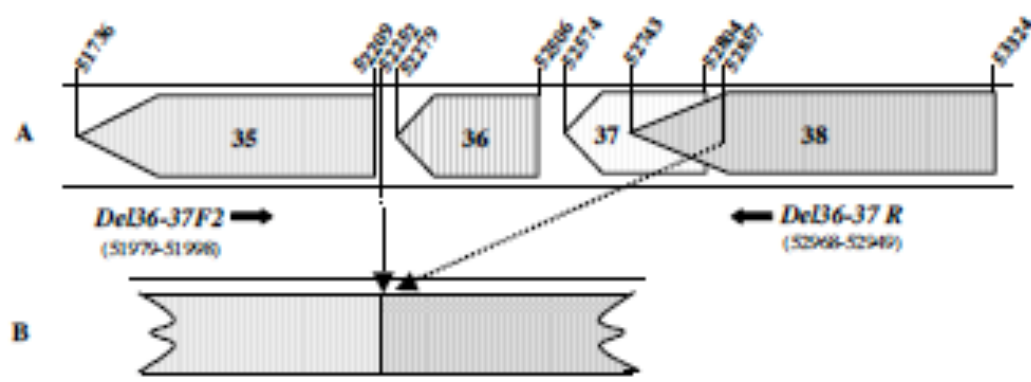


Figure 1

274

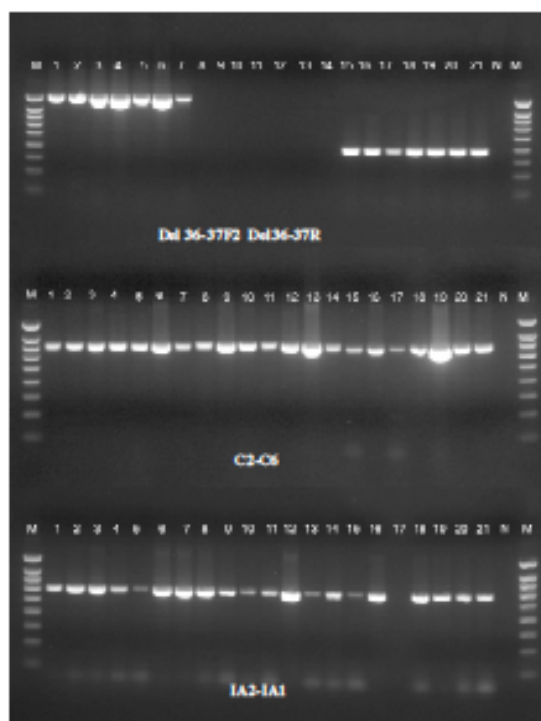


Figure 2A

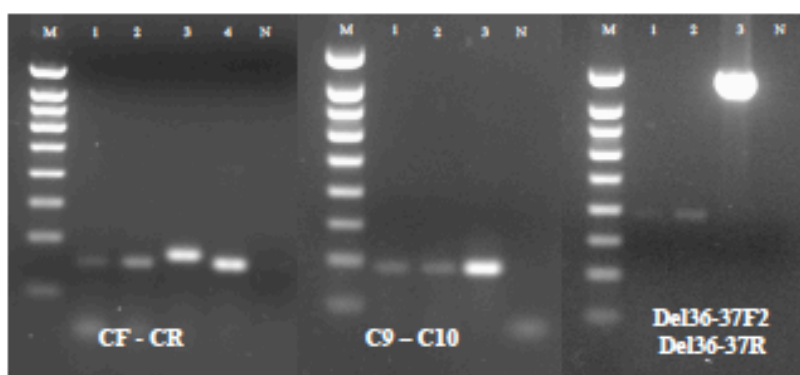


Figure 2B

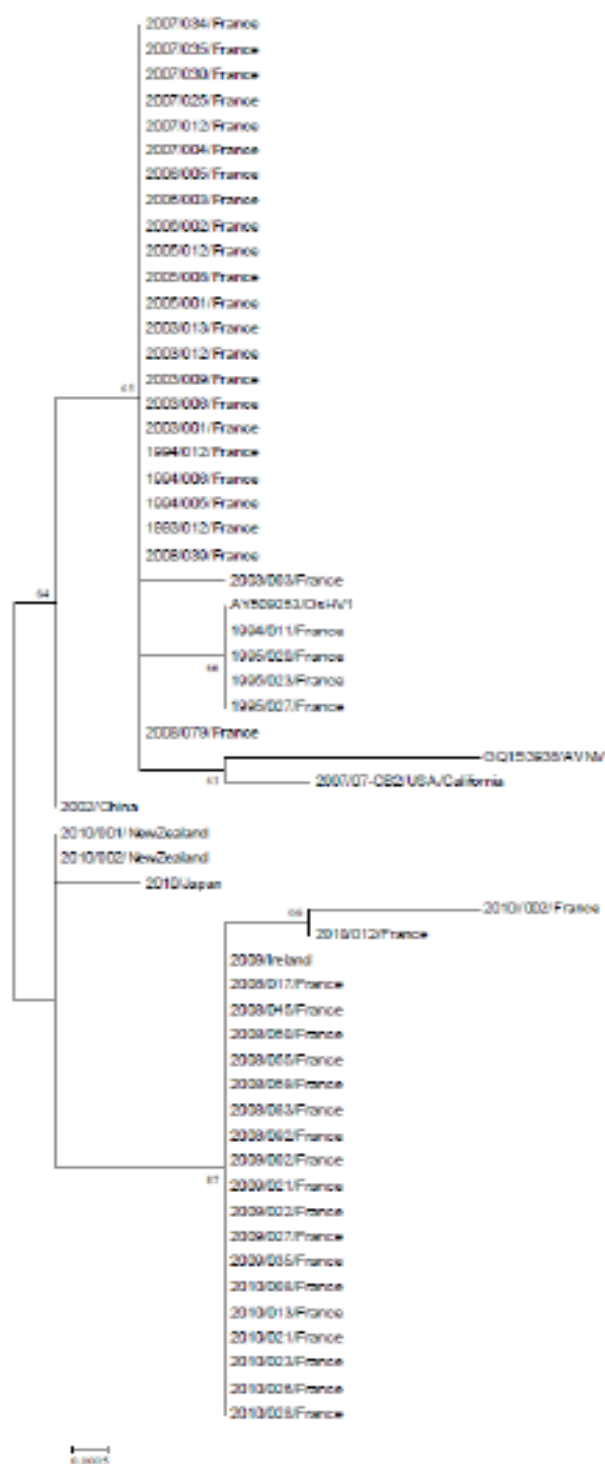


Figure 3

Table

Table 1 List of isolation codes of DNA extracted from *C. gigas* samples, geographical origins, years of sampling, stages of development, and GenBank accession numbers

Isolate code	Geographical origin of isolate	Yr of sampling	Development stage or age of isolate source	GenBank accession no. for sequence obtained with indicated primer pair		
				C2 and C5	Del 36-37F2 and Del 36-37R	IA1 and IA2
1993/002	France	1993	Larval	JN80065		JN800134
1993/004	France	1993	Larval	JN80066		JN800135
1993/012	France	1993	<1 yr	JN80067	JN800201	JN800136
1994/005	France	1994	<1 yr	JN80068	JN800202	JN800137
1994/006	France	1994	<1 yr	JN80069	JN800203	JN800138
1994/011	France	1994	<1 yr	JN80070	JN800204	JN800139
1994/012	France	1994	Larval	JN80071	JN800205	JN800140
1995/020	France	1995	Larval	JN80072	JN800205	JN800141
1995/023	France	1995	Larval	JN80073	JN800206	JN800142
1995/027	France	1995	Larval	JN80074	JN800207	JN800143
2003/001	France	2003	<1 yr	JN80075	JN800208	JN800144
2003/003	France	2003	<1 yr	JN80076	JN800209	JN800145
2003/006	France	2003	<1 yr	JN80077	JN800210	JN800146
2003/009	France	2003	<1 yr	JN80078	JN800211	JN800147
2003/012	France	2003	<1 yr	JN80079	JN800212	JN800148
2003/013	France	2003	<1 yr	JN80080	JN800213	JN800149
2005/001	France	2005	<1 yr	JN80081	JN800214	JN800150
2005/005	France	2005	<1 yr	JN80082	JN800215	JN800151
2005/008	France	2005	Larval	JN80083	JN800216	JN800152
2005/012	France	2005	<1 yr	JN80084	JN800217	JN800153
2006/002	France	2006	Larval	JN80085	JN800218	JN800154
2006/003	France	2006	Larval	JN80086	JN800219	JN800155
2006/005	France	2006	Larval	JN80087	JN800220	JN800156
2006/009	France	2006	<1 yr	JN80088		JN800157
2006/013	France	2006	<1 yr	JN80089		JN800158
2006/018	France	2006	<1 yr	JN80090		JN800159
2007/004	France	2007	Larval	JN80091	JN800221	JN800160
2007/012	France	2007	Adult	JN80092	JN800222	JN800161
2007/025	France	2007	<1 yr	JN80093	JN800223	JN800162
2007/026	France	2007	<1 yr	JN80094		JN800163
2007/028	France	2007	<1 yr	JN80095		JN800164
2007/029	France	2007	<1 yr	JN80096		JN800165
2007/030	France	2007	<1 yr	JN80097	JN800224	JN800166
2007/034	France	2007	1-2 yr	JN80098	JN800225	JN800167
2007/035	France	2007	<1 yr	JN80099	JN800226	JN800168
2008/017	France	2008	<1 yr	JN800100	JN800227	JN800169
2008/019	France	2008	1-2 yr	JN800101		JN800170
2008/021	France	2008	Larval	JN800102		JN800171
2008/023	France	2008	Adult	JN800103		JN800172
2008/025	France	2008	Adult	JN800104		JN800173
2008/030	France	2008	Adult	JN800105		JN800174
2008/039	France	2008	Larval	JN800106	JN800228	JN800175
2008/045	France	2008	1-2 yr	JN800107	JN800229	JN800176
2008/050	France	2008	<1 yr	JN800108	JN800230	JN800177
2008/055	France	2008	<1 yr	JN800109	JN800231	JN800178
2008/059	France	2008	<1 yr	JN800110	JN800232	JN800179
2008/073	France	2008	1-2 yr	JN800111		JN800180
2008/079	France	2008	<1 yr	JN800112	JN800233	JN800181
2008/083	France	2008	<1 yr	JN800113	JN800234	JN800182
2008/092	France	2008	<1 yr	JN800114	JN800235	JN800183
2009/002	France	2009	<1 yr	JN800115	JN800236	JN800184
2009/021	France	2009	<1 yr	JN800116	JN800237	JN800185
2009/022	France	2009	<1 yr	JN800117	JN800238	JN800186
2009/027	France	2009	<1 yr	JN800118	JN800239	JN800187
2009/035	France	2009	<1 yr	JN800119	JN800240	JN800188
2010/002	France	2010	<1 yr	JN800120	JN800241	JN800189

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Isolate code	Geographical origin of isolate	Yr of sampling	Development stage or age of isolate source	GenBank accession no. for sequence obtained with indicated primer pair		
				C2 and C6	Del 36-37F2 and Del 36-37R	IA1 and IA2
2010/008	France	2010	<1 yr	JN800121	JN800242	JN800190
2010/012	France	2010	<1 yr	JN800122	JN800243	JN800191
2010/013	France	2010	<1 yr	JN800123	JN800244	JN800192
2010/021	France	2010	<1 yr	JN800124	JN800245	JN800193
2010/023	France	2010	<1 yr	JN800125	JN800246	JN800194
2010/026	France	2010	<1 yr	JN800126	JN800247	JN800195
2010/028	France	2010	<1 yr	JN800127	JN800248	JN800196
2002/E50	China	2002		JN800132	JN800253	
2007/07-CB12	USA (California)	2007		JN800128	JN800249	JN800197
2010/158-144	Japan	2010	<1 yr	JN800133	JN800254	
2009/Ireland	Ireland	2009		JN800129	JN800250	JN800198
2010/01	New Zealand	2010	<1 yr	JN800130	JN800251	JN800199
2010/02	New Zealand	2010	Larval	JN800131	JN800252	JN800200
2005/2E*	New Zealand	2005	<1 yr			
2005/2H*	New Zealand	2005	<1 yr			
2005/BN1C*	New Zealand	2005	<1 yr			

* DNA extracted from histological blocks.

Article n°6

Schikorski et al. *Veterinary Research* 2011, **42**:27
<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/27>



RESEARCH

Open Access

Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility

David Schikorski*, Tristan Renault*, Denis Saulnier, Nicole Faury, Pierrick Moreau, Jean-François Pépin

Abstract

In 2008 and 2009, acute mortalities occurred in France among Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, spat. Different hypothesis including the implication of environmental factors, toxic algae and/or pathogens have been explored. Diagnostic tests indicated that OsHV-1 including a particular genotype, termed OsHV-1 µVar, was detected in most of samples and especially in moribund oysters with the highlighting of virus particles looking like herpes viruses by TEM examination. In this study, an experimental protocol to reproduce OsHV-1 infection in laboratory conditions was developed. This protocol was based on the intramuscular injection of filtered (0.22 µm) tissue homogenates prepared from naturally OsHV-1 infected spat collected on French coasts during mortality outbreaks in 2008. Results of the experimental trials showed that mortalities were induced after injection. Moreover, filtered tissue homogenates induced mortalities whereas the same tissue homogenates exposed to an ultraviolet (UV) treatment did not induce any mortality suggesting that oyster spat mortalities require the presence of a UV sensitive agent. Furthermore, analysis of injected oyster spat revealed the detection of high amounts of OsHV-1 DNA by real-time quantitative PCR. Finally, TEM analysis demonstrated the presence of herpes virus particles. The developed protocol allowed to maintain sources of infective virus which can be useful for the development of further studies concerning the transmission and the development of OsHV-1 infection.

Introduction

World mollusc aquaculture is characterised by a focus on a limited number of species including oysters being raised at an industrial level. The oyster industry has grown to be very important for many regions of the world contributing substantially to social and economic activity in the coastal zones. The yearly European oyster production is the 126 000 tonnes, France being the leading Member State (115 000 tonnes/year) [1]. The French oyster production is essentially based on the rearing of the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*. This species has been introduced in France from Canada and Japan in the early 70's after the extinction of the Portuguese oyster *C. angulata* related to irido-like virus infections [2].

However, since the late 80's abnormal mortality events have been reported in France among *C. gigas* oysters in the field and in hatcheries/nurseries [3-5]. These

mortalities were usually sudden and severe (up to 100%), and affected essentially spat (oysters less than one year old) and juveniles (12 to 18 month old oysters). Mortality outbreaks took place currently during the summer period from mid May to July concomitantly with a rapid increase of seawater temperature (Garcia et al., unpublished data). These recurrent mortality events have been mainly associated to the detection of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), the sole member of the *Malacoherpesviridae* family [6-8].

The first description of a virus morphologically similar to herpes viruses was reported by Farley et al. [9] in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Herpes-like virus infections have then been noticed worldwide in several other mollusc species in association with massive mortality episodes, such as in oysters [10-17], in clams [11,18], in scallops [19] and in abalone [20-22]. Data available in literature [4] and those collected during an epidemiological survey conducted by the French National Network for Surveillance and Monitoring of Mollusc Health (Repamo) between 1997 and 2006

* Correspondence: tristan.renault@ifremer.fr
 Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer),
 Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17900 La Tremblade, France



© 2011 Schikorski et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

suggested a causal link between spat mortality and OsHV-1 detection in France (Garcia et al., unpublished data). Results of diagnostic tests indicated that OsHV-1 was detected in most of samples collected during mortality outbreaks and especially in moribund oysters (Garcia et al., unpublished data). To date, the infectivity of OsHV-1 was univocally demonstrated towards early stages of *C. gigas* through experimental trials. Experimental transmission assays have demonstrated that healthy larvae could be infected by contact with filtered (0.22 µm) tissue homogenates prepared from infected larvae [10,11,23,24]. So far, assays to reproduce the virus disease in experimental conditions on oyster spat have been inconclusive [25].

Massive mortality outbreaks in *C. gigas* oysters were reported in France, Ireland and the Channel Islands in 2008 and 2009 resulting in a shortage in supplies of the shellfish over the next years. Different hypothesis including the implication of environmental factors, toxic algae and/or pathogens have been explored. In this context, oyster samples were collected from all affected locations in France and tested in order to identify pathogens. Different analyses were carried out including histology, bacteriology, PCR for the detection of OsHV-1 [26,27], *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* [28], transmission electron microscopy (TEM), and experimental trials. Results of diagnostic tests indicated (Renault et al., unpublished data) that (i) there was no listed pathogen involved, (ii) OsHV-1 was detected in most of samples especially in moribund oysters, (iii) *V. splendidus*, *V. aestuarianus* and *V. harveyi* were also detected and (iv) virus particles looking like herpes viruses were observed by TEM in moribund tested oysters.

Experimental trials were also performed in order to reproduce mortality from naturally infected oysters collected in 2008 during mortality outbreaks and to test the hypothesis of infectious disease aetiology. In this context, an experimental protocol was developed. This protocol was based on (i) infectious tissue homogenates prepared from naturally infected oysters collected in the field during mortality outbreaks and (ii) intramuscular injection of these tissue homogenates in healthy appearing oyster spat. Mortality was daily monitored after injection and OsHV-1 DNA systematically researched by real time quantitative PCR. Some samples were also subjected to TEM analysis.

Materials and methods

Oysters

Three batches of moribund *Crassostrea gigas* oysters were collected on the field along the French coasts during abnormal mortality outbreaks in 2008 (Table 1). The first batch was composed of oysters collected at Gouville (Normandy - Cotentin), the second of oysters collected

in the estuary of the Etel river (Brittany - Morbihan), and the last one corresponded to oysters collected on the site of Aulne located in the Bay of Brest (Brittany - Finistère). These animals were checked for OsHV-1 detection and served for the preparation of tissue homogenates. A control tissue homogenate was prepared from the batch of healthy appearing oysters used for experimental assays and showing no mortality in 2008 (see below; Table 1).

Experimental infection trials were performed on healthy appearing *C. gigas* spat (one year old) purchased in November 2008 from a shellfish farm located on the French Mediterranean coast. No mortality event has been reported at this shellfish farm location during 2008. Oyster spat sized around 40 mm in length, with a mean weight of 5 grams. Oysters were placed in the Ifremer's facilities (Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade, France) in a single tank of 200 L containing filtered (1 µm) seawater and slowly acclimated to 22°C increasing the temperature of 1°C per day. During this period, oysters were fed daily by addition of 2 liters of microalgae *Skeletonema costatum* (1.5 10³ cells/mL). Oysters did not present any mortality or other symptom of disease at this time. At the end of the acclimatization period and just before the beginning of the experiment, a set of 20 individuals was assessed by real time quantitative PCR in order to evaluate the initial OsHV-1 DNA detection.

No ethical approval has been requested for the present study because experimental research has been conducted on Pacific oysters (invertebrates). Oysters don't possess a central nervous system.

Preparation of oyster tissue homogenates

Initial tissue homogenates were prepared using ten animals from each batch (Table 1). Oysters were open by removing the superior valve. To verify that animals were OsHV-1 infected, a small piece of mantle (25 mg) was sampled from each individual used and frozen at -20°C before DNA extraction and OsHV-1 detection by real time quantitative PCR. Gills and mantle of these animals were then dissected and pooled together in a 50 mL sterile tube. All subsequent dilutions were made using 0.22 µm filtered artificial seawater (ASW). The total mass of tissues was weighted and 10 volumes of 0.22 µm ASW were added in the tube (9 mL of seawater per g of tissues). Tissues were then crushed on ice using an Ultraturax mixer (3 × 5 s). After centrifugation (1000 g, 5 min, 4°C), supernatant was placed in a new tube and diluted by addition of 4 volumes of ASW. Finally, the clarified tissue homogenate was filtered consecutively in sterile conditions using syringe filters at 5 µm, 2 µm, 0.45 µm and 0.22 µm pore sizes (Millipore; Billerica, USA).

Table 1 Description of the four different initial tissue homogenates made from naturally OsHV-1 infected oyster spat collected on the field in France during the abnormal mortality outbreak in 2008

Name	Origin of animals	Virus DNA amount	OsHV-1 genotype
Homogenate 1	Normandy (Cotentin)	421×10^2	μVar
Homogenate 2	South Brittany (Morbihan)	218×10^2	μVar
Homogenate 3	North Brittany (Bay of Brest)	203×10^2	μVar
Homogenate 4	Mediterranean sea	0	-

Virus DNA amounts of oyster tissue homogenates were quantified by real-time quantitative PCR and expressed as the number of virus DNA copies per μL of water. OsHV-1 genotypes of homogenates were determined by sequencing of the virus genome.

Other filtered tissue homogenates were prepared using the same protocol from dying and dead animals after intramuscular injections. Similarly, control tissue homogenates were also prepared using healthy oysters (oysters from Mediterranean coast).

Filtered tissue homogenates were stocked at 4°C until use. A volume of 200 μL of each filtered tissue homogenate was sampled and stored at -20°C for further DNA extraction and OsHV-1 DNA quantification by real time quantitative PCR.

Experimental design: intramuscular injection of filtered tissue homogenates

Each experimental trial (6 assays were conducted in triplicates) was carried out using 8 healthy oyster spat (Experiment 1, Figure 1) or 10 healthy oyster spat (Experiment 2 to 6, Figure 1). Animals were first placed out of water for 24 h at 22°C and then anesthetized during 4 h in a solution containing 7% (w/v) magnesium chloride (MgCl₂ 50 g/L) in seawater (1 v)/distilled water (4 v) [29]. Once a time relaxed, 100 μL of a filtered tissue homogenate exposed or not to an UV treatment were injected into the adductor muscle using a 1 mL micro-syringe equipped with 18-g needles.

Filtered tissue homogenates in Experiment 2 were subjected to a UV treatment adapted from Chan and Guilbert [30]. Samples were exposed 15 min at 10 cm of a UV lamp (VL115-C, Vilber Lourmat, 15 W) emitting a dose of 1.08 mW/cm² at 254 nm.

Negative controls (Experiments 1 to 6) consisted of oysters intramuscularly injected with control tissue homogenates prepared from healthy spat. Inoculated oysters were then placed at 22°C in 5 L tanks supplied in filtered (1 μm) seawater without food supply. Mortality was daily monitored during a 7 day period. Dead oysters were removed from tanks during the time course of the experiments and a piece of mantle (25 mg) was sampled on each dead individual. Samples of mantle were also dissected on surviving oysters which were sacrificed at the end of experiments. All tissue samples were frozen at -20°C for further DNA extraction and OsHV-1 detection by real time quantitative PCR.

DNA extraction

Total DNA was extracted from tissue fragments (mantle) and tissues homogenates (mantle + gills) using the QIAgen (Hilden, Germany) QIAamp tissue mini kit combined with the use of the QIAcube automate according to the manufacturer's protocol.

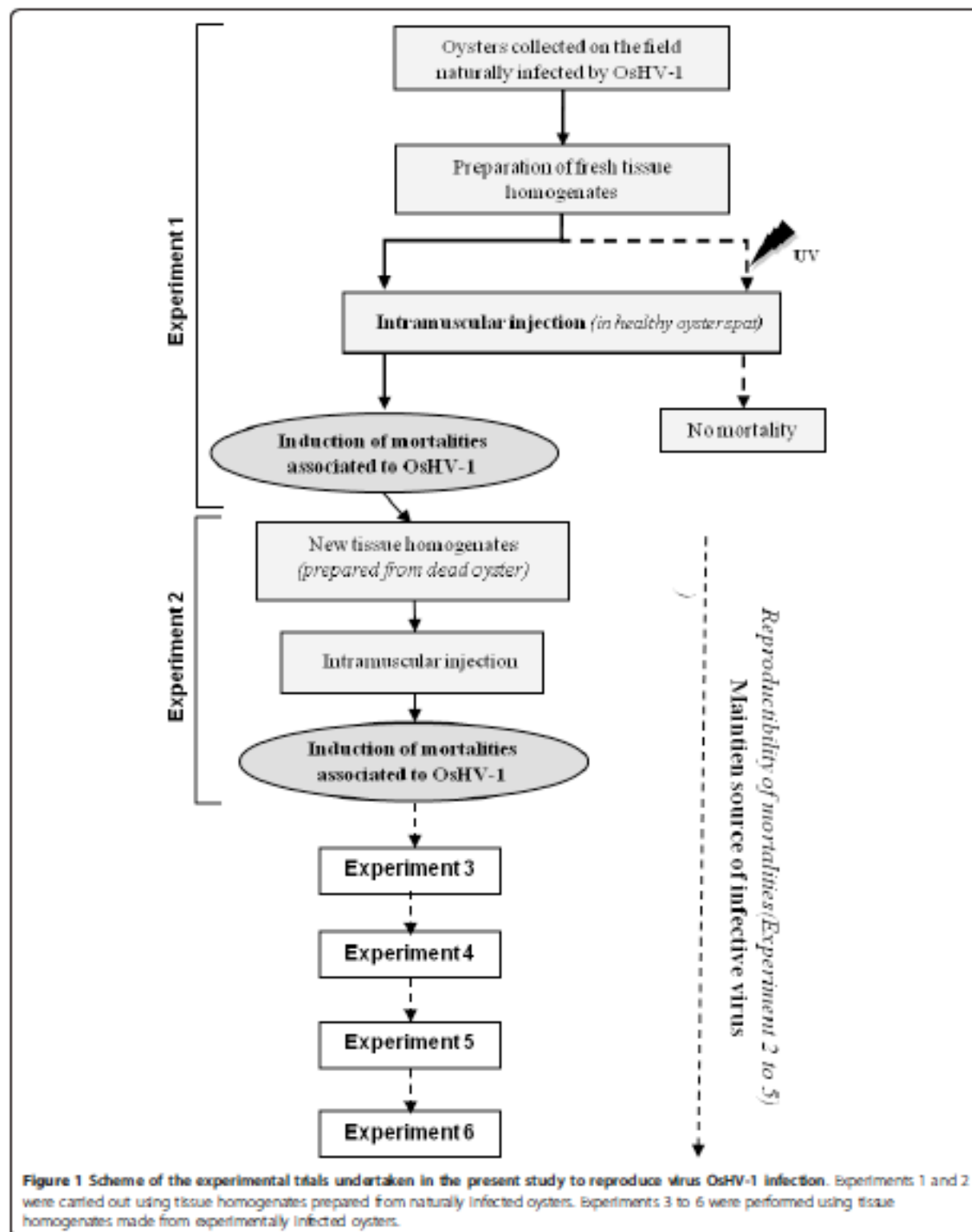
Briefly, samples of mantle were digested overnight on a rocking platform at 56°C by addition of 180 μL of ATL supplied buffer with 20 μL of proteinase K per 25 mg of sample. When the tissue was completely lysed, total volume of 200 μL of lysate was transferred into a 2 mL microcentrifuge tube and DNA extraction with QIAamp Mini spin columns was carried out using a QIAcube automate. Final elution of DNA extracted from mantle samples was performed with 200 μL of double-distilled water.

For tissue homogenates, DNA was extracted from 200 μL of samples and performed manually with a final elution with 50 μL of double-distilled water.

DNA concentrations and DNA quality were measured using a spectrophotometer Eppendorf (Hamburg, Germany). Extracted DNA was stored at -20°C prior OsHV-1 detection and quantification by real time quantitative PCR.

OsHV-1 DNA quantification by real time quantitative PCR

The detection and quantification of OsHV-1 DNA was carried out using real-time PCR [26]. After dilution at 2 ng/μL, 5 μL of DNA samples were added to the reaction mix composed of 12.5 μL of Brilliant[®] SYBR Green Master Mix reagent (Agilent; Santa Clara, USA), 2.5 μL of both C9 forward and C10 reverse primers [31] diluted at the concentration of 2 μM each, and 2.5 μL of distilled water. All amplification reactions were performed using a Mx3000P real-time PCR thermocycler (Agilent) with 96-microwell plates according to the following conditions: 1 cycle of pre-incubation at 95°C for 10 min; 40 cycles of amplification at 95°C for 30 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final step for melting temperature curve analysis at 95°C for 1 min, 60°C for 30 s, and 95°C for 30 s. The specificity of the PCR products was systematically checked with the melting temperature value calculated from the dissociation curve [32].



Absolute quantification of OsHV-1 DNA copies was carried out by comparing CT values obtained for tested samples with the standard curve based on a ten-fold dilution curve derived from a stock solution of OsHV-1 genomic DNA (5×10^6 copies/ μ L) extracted from purified virus particles [6]. Efficiency (E) and linearity (R^2) were calculated from the standard curve with MxPro v3.0 software (Agilent), and tested for each run. All samples were analyzed in triplicate. The results were expressed as a \log_{10} of the virus DNA copy number per ng of total DNA or per μ L of control or infectious homogenates.

Transmission electron microscopy examination

Fragments of mantle, adductor muscle and digestive gland were collected from 3 moribund oysters after injection of filtered tissue homogenate (Experiment 1, Figure 1) and fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h at 4°C. After 2 washes in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2), samples were post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer (1 h, 4°C). The samples were then washed in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2) (2×15 min), dehydrated in a graded series of ethanol (70%, 10 min; 95%, 2×15 min; 100%, 3×20 min at room temperature), cleared in propylene oxide (2×20 min), infiltrated (propylene oxide/Epon resin (vol/vol), 1 h at room temperature; Epon resin, 1 h at room temperature) and embedded in Epon resin (48 h at 60°C). Ultrathin sections were cut using a Leica (Wetzlar, Germany) microtome, collected on copper grids and double stained with uranyl acetate and lead citrate using conventional techniques. Examination was carried out on a JEOL JEM 1011 (Tokyo, Japan) transmission electron microscope at 60 kV.

Sequencing of OsHV-1 genome

OsHV-1 isolates were characterized by sequencing PCR products using primer sets targeting two regions of the virus genome, the region 1A (ORF43) that encodes a putative apoptosis inhibitor and the region C (ORF4) that encodes two proteins of unknown function [33]. The first primer pair used 1A1/1A2 (1A1: CGC GGT TCA TAT CCA AAG TT/1A2: AAT CCC CAT GTT TCT TG CTG) amplified a 607 bp fragment and the second primer pair, C2/C6 a (C2: CTC TTT ACC ATG AAG ATA CCC ACC/C6: GTG CAC GGC TTA CCA TTT TT) amplified a 709 bp fragment. The sequencing reaction was carried out into a 10 μ L final volume, containing 1.8 μ L of sequencing buffer, 0.4 μ L of BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems; Carlsbad, USA), 1.5 μ L of primer Forward or Reverse at 4 μ M, fresh purified PCR products and 10 μ L sterile DNase and RNase free water. The program consisted of an initial

denaturation of 3 min at 96°C followed by 35 cycles of 30 s at 96°C, 30 s at 50°C and 4 min at 60°C. This reaction was performed using a 96-well plate. Sequencing reactions were then purified as follows. In each sample, 60 μ L of 100% ethanol were added and samples were centrifuged at 1500 g for 30 min. The plate was inverted to remove ethanol. Then, 60 μ L 70% ethanol were added, followed by centrifugation of the plate at 1000 g for 10 min. The plate was then centrifuged upside down for 30 s to remove ethanol. Finally, samples were dried in a Speed Vac and re-suspended with 10 μ L deionized formamide. Samples were loaded in ABI PRISM[®] 3130 XL-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using a 36 cm capillary array and POP 7 polymer. Sequences were edited with Chromas lite 2.01 version software. A multiple alignment was achieved by Bioedit 7.0.9 version software using the algorithm CLUSTAL W. Sequence results were compared to the consensus sequence OsHV-1 available on GENBANK [accession number AY509253].

Statistical analysis

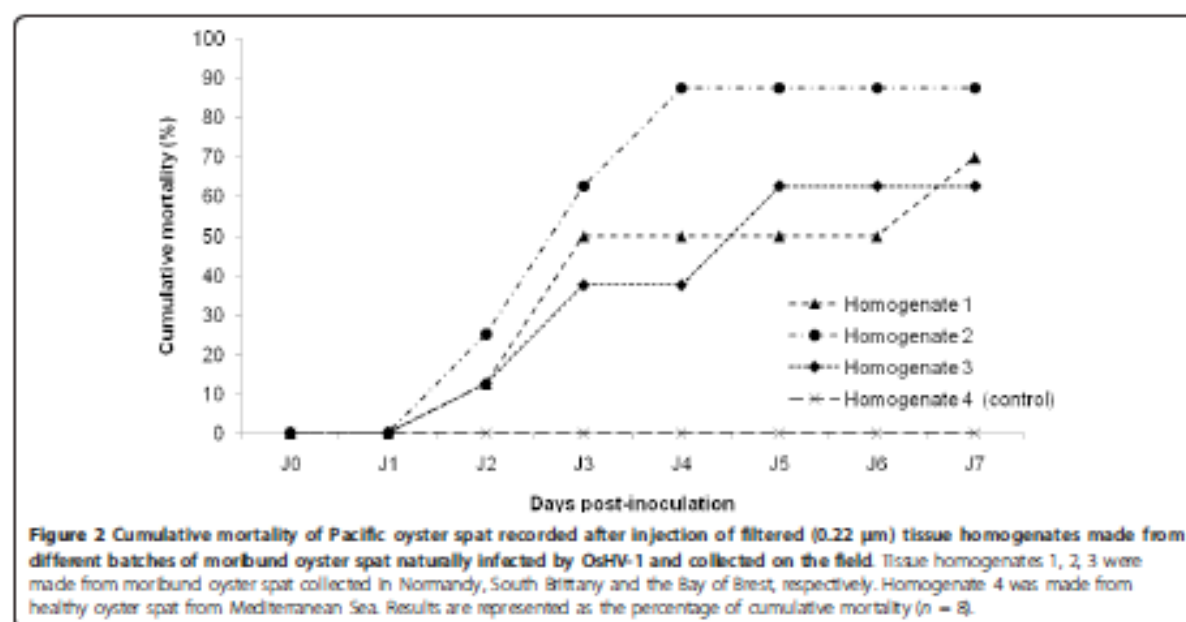
Statistical analyses were carried out using the XLSTAT-Pro[®] v7.5.3 software (Addinsoft; Paris, France). Mortality rates after injection of the different tissue homogenates were tested using a χ^2 test. A non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn post-hoc comparison test was performed to compare differences between means of virus DNA amounts (DNA copy number) quantified in dead or alive oyster tissues. A P-values level of 0.05 was used in all tests to identify significant effects or differences.

Results

Inducing oyster mortality by tissue homogenate injection

In a first experiment (Experiment 1), four filtered tissue homogenates (Table 1) were tested by intramuscular injection in healthy oyster spat. Tissue homogenates 1, 2 and 3 were prepared using moribund oysters which proved to be naturally infected by OsHV-1 collected in Normandy (Cotentin), in South Brittany (Morbihan) and in the Bay of Brest (Finistère), respectively (Table 1). OsHV-1 DNA amounts quantified in filtered tissue homogenates 1, 2 and 3 were 4.21×10^2 , 2.18×10^3 and 2.03×10^2 DNA copies/ μ L, respectively. Moreover, sequence analysis revealed the presence of OsHV-1 μ Var genotype in the three tissue homogenates [33]. No virus DNA was detected in the filtered tissue homogenate 4 which was prepared from a batch of healthy oysters collected from Mediterranean coast (Table 1).

For the first experiment (Experiment 1), mortality rates recorded in healthy oyster spat after intramuscular injection of tissue homogenates were represented on Figure 2. For tissue homogenate 1, the cumulative



mortality rate reached 50% at day 3 post injection and remained stable until day 6, before to reach 70% at day 7. For tissue homogenate 3, the cumulative mortality rate reached 40% at day 3 post injection before to get around 65% at day 5 until the end of the experiment. Oyster spat intramuscularly injected with tissue homogenate 2 demonstrated a cumulative mortality rate of 25% 2 days post-injection. The mortality rate reached gradually 90% at day 4 and stayed stable until the end of the experiment. The mortality rates observed after injection of tissue homogenate 3 appeared significantly higher from the fourth day of the experiment to those observed with tissue homogenates 1 and 2. No mortality was observed in oyster spat injected with tissue homogenate 4, which constituted the negative control tissue homogenate (Figure 2).

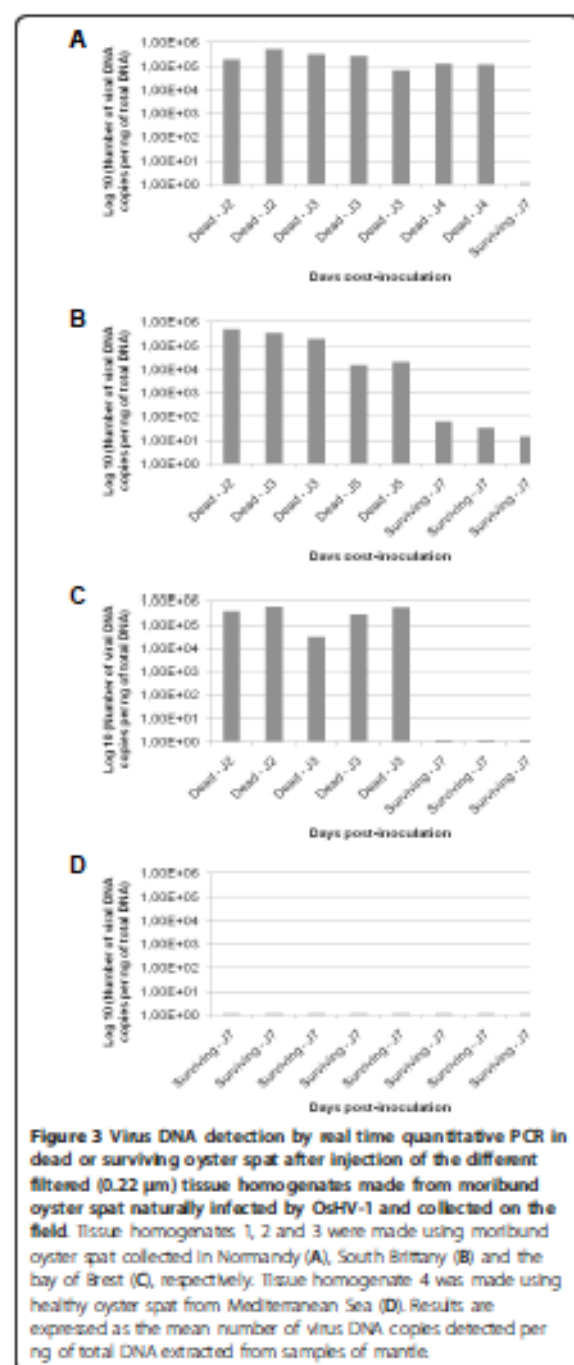
The quantification of OsHV-1 DNA was carried out in dying or dead individuals collected during the time course of the experiment (Experiment 1) and in surviving individuals collected at the end of the experiment (Figure 3). The average virus DNA amounts were 3.67×10^5 , 2.35×10^5 and 2.17×10^5 DNA copies/ng of total DNA extracted from mantle in dying or dead oysters injected with tissue homogenates 1, 2 and 3, respectively. Individual virus DNA amounts ranged from 3.19×10^4 to 5.93×10^5 , 6.67×10^4 to 5.23×10^5 , and 1.59×10^4 to 5.07×10^5 DNA copies/ng of total DNA extracted from mantle for dying or dead oysters, injected with tissue homogenates 1, 2 and 3, respectively. No virus DNA was detected in surviving

individuals, except for oysters surviving after injection of the tissue homogenate 3 which presented a maximum virus DNA amount of 6.13×10^1 DNA copies/ng of total DNA extracted from mantle. No virus was detected in animals injected with the negative control tissue homogenate (tissue homogenate 4).

Transmission electron microscopy of 3 moribund oysters after injection of tissue homogenate 1 (Experiment 1, Figure 1) revealed virus particles with morphology that closely resembled herpes viruses in the adductor muscle, the mantle (Figure 4A and 4B) and the digestive gland. These oysters were collected two days after injection of the filtered (0.22 μ m) tissue homogenate. Intra-nuclear empty capsids, nucleocapsids and enveloped particles were noticed (Figure 4A and 4C). Moreover, numerous particles interpreted as Light particles (L-particles; capsidless particles) were also observed into perinuclear cisterna and cytoplasmic vesicles of infected cells (Figure 4C and 4D). L-particles were spherical, ranged in size between 76 nm and 63 nm and contained homogeneous granular material of low electron density.

Effect of UV treatment on oyster mortality induction

The effect of UV treatment on the infectivity of tissue homogenates was investigated in a second experiment (Experiment 2). Injection of tissue homogenates 1 and 2 induced cumulative mortality rates of 40% three days post-injection before to reach 70% and 80% at the end of the experiment on day 7, respectively (Figure 5). No



mortality was recorded among oysters injected with tissue homogenates 1 and 2 previously exposed to an UV treatment (Figure 5).

The virus DNA quantification was determined in dying or dead individuals collected during the time

course of the experiment (Experiment 2), (Figure 6). The average virus DNA amounts were 2.51×10^5 and 3.91×10^5 DNA copies/ng of total DNA after injection of tissue homogenates 1 and 2, respectively. Individual OsHV-1 DNA amounts ranged from 7.83×10^3 to 6.55×10^5 and 1.51×10^1 to 1.86×10^5 DNA copies/ng of total DNA extracted from mantle after injection of tissue homogenates 1 and 2, respectively.

Virus DNA was also detected in surviving individuals collected at the end of the experiment with values reaching up to 1.86×10^5 and 4.19×10^5 DNA copies/ng of total DNA after injection of tissue homogenates 1 or 2, respectively (Figure 6). Statistical analysis revealed that the average virus DNA amounts detected in the mantle of oyster spat were not significantly different in dying or dead individuals after injection of tissue homogenates 1 and 2. No virus DNA was detected in oyster spat surviving to the injection of tissue homogenate 1 previously exposed to UV. Only two individuals were positive for OsHV-1 DNA detection in individuals injected with tissue homogenate 2 previously exposed to UV at very low levels (1.97 and 4.28 OsHV-1 DNA copies/ng of total DNA).

Reproducing mortalities in experimental conditions

To demonstrate the reproducibility of inducing oyster mortalities in experimental conditions by intramuscular injection of tissue homogenates containing OsHV-1 DNA, four successive experimental transmission trials (Experiments 3 to 6) were carried out (Figure 1). Each experiment was carried out by injecting in the adductor muscle of healthy oyster spat a tissue homogenate prepared from dead oysters collected during the previous experimental assay. Dying or dead oysters collected after intramuscular injection of the initial tissue homogenate 2 were used to prepare the first tissue homogenate from experimentally infected oysters (Figure 1). The mean mortalities recorded during the four consecutive experimental transmission trials were around 40% two days after injection (Figure 7). Mean mortality rates increased gradually to reach 80% at day 4 and 85% at the end of the experiments at day 7. No statistical differences were evidenced between mean mortality rates recorded during these four consecutive experimental transmission trials and the mortality rates previously reported after the first intramuscular injection of the tissue homogenate 2 (Experiments 1 and 2). Moreover, the mortality rates reported at each monitoring point were not significantly different between the four consecutive trials.

Average virus DNA amounts quantified in the mantle of dying or dead individuals collected during experimental transmission assays were estimated at 1×10^6 , 8.32×10^5 , 5.37×10^5 and 4.01×10^5 DNA copies/ng total DNA, respectively (Figure 8). These virus DNA amounts

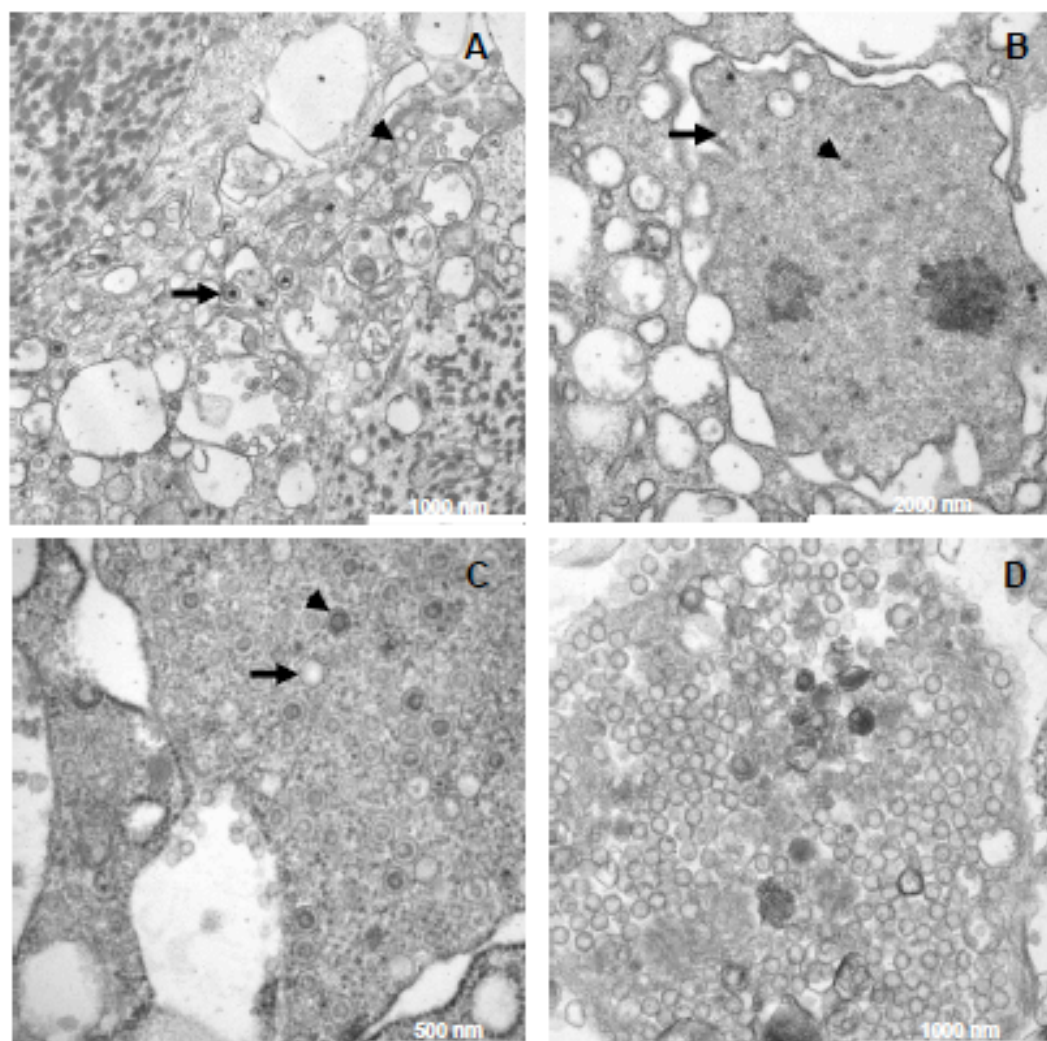


Figure 4 Transmission electron micrographs of OsHV-1 infected tissues from Pacific oyster spat. **A:** enveloped particles (arrows) and L-particles (arrows head) detected in adductor muscle tissue. Scale bar = 1 μ m; **B:** capsids (arrows) and nucleocapsids (arrows head) detected in the nucleus of an infected cell in the mantle. Scale bar = 2 μ m; **C:** high magnification of capsids (arrows) and nucleocapsids (arrows head) present in the nucleus of a mantle cell from an infected oyster. Scale bar = 500 nm; **D:** high magnification of L-particles detected in the mantle of an infected oyster. Scale bar = 1 μ m.

were not significantly different between the different trials. The quantification of OsHV-1 DNA was also carried out in each different tissue homogenates used. Virus DNA amounts of 2.50×10^6 , 2.01×10^5 , 3.02×10^5 and 8.25×10^4 DNA copies/ μ L were detected in tissue homogenates injected during the four experimental transmission assays, respectively.

Discussion

Significant cumulative mortality rates (around 80%) were observed in healthy oyster spat intramuscularly injected

with filtered (0.22 μ m) tissue homogenates prepared from naturally OsHV-1 infected oysters (Experiments 1 and 2). First mortality was reported two days after injection. As suggested by Sauvage et al., this period may correspond to an intense replication phase leading to irreversible cell damages resulting in mortality [34].

In addition, tissue homogenates prepared from experimentally infected oyster spat induced also high mortality rates (Experiments 3 to 6) demonstrating the reproducibility of the experimental protocol. Finally, filtered tissue homogenates exposed to UV did not induce any

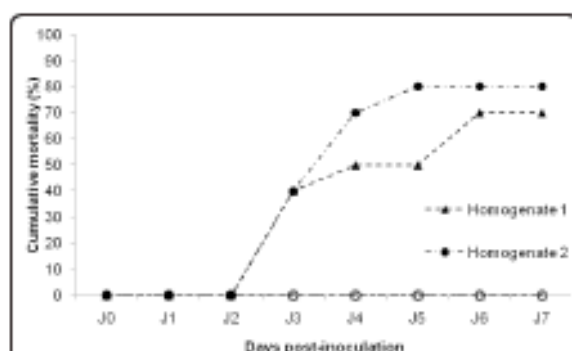


Figure 5 Cumulative mortality of Pacific oyster spat recorded after injection of two different filtered (0.22 μ m) tissue homogenates exposed or not to a UV treatment. Tissue homogenates 1 and 2 were made from moribund oyster spat collected in Normandy and South Brittany, respectively. Results are represented as the percentage of cumulative mortality ($n = 10$).

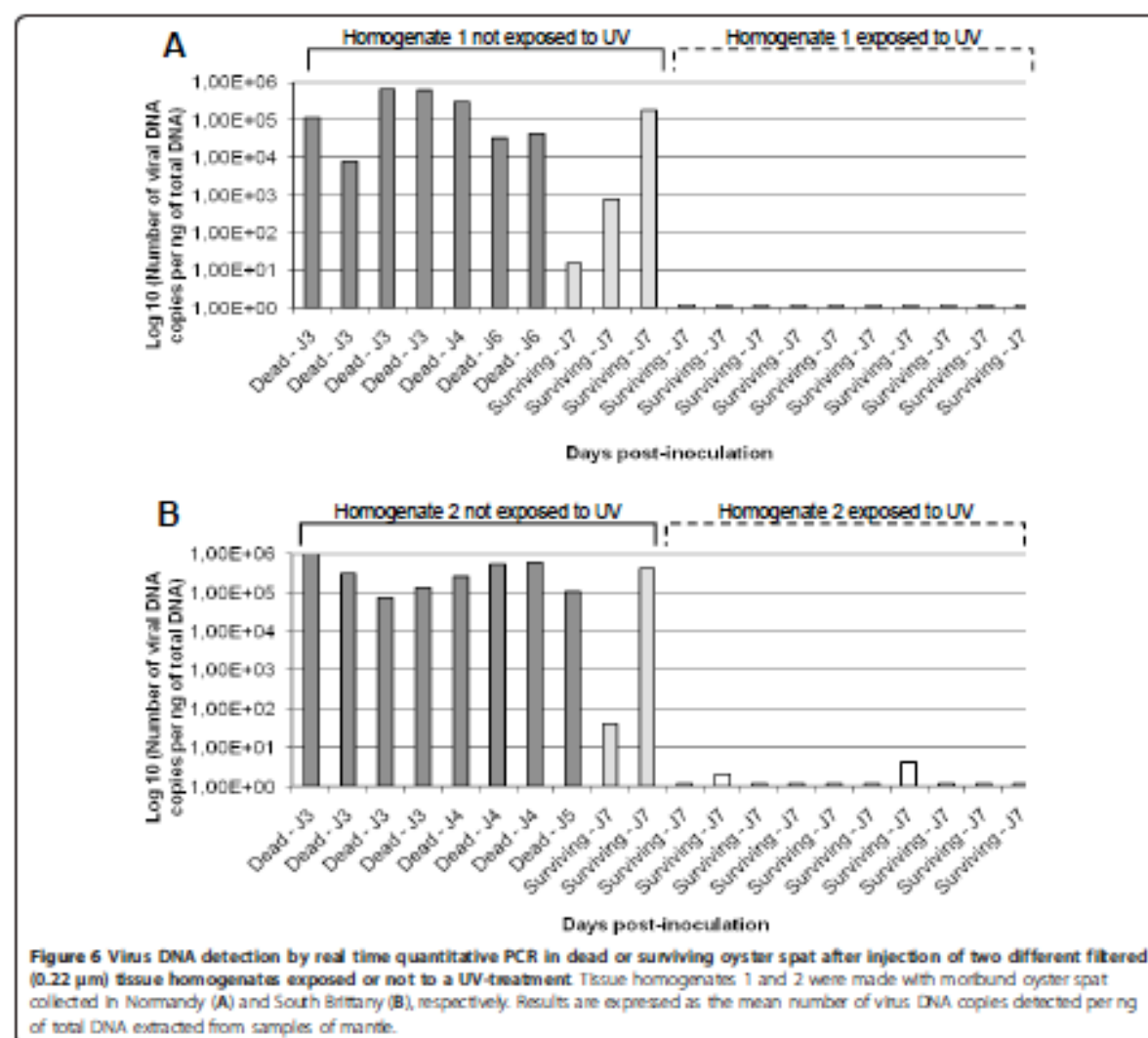
mortality. These results suggest that induced mortality in experimental conditions was related to the presence in oyster tissue homogenates of an infectious agent under 200 nm in size and sensitive to UV treatment. Filtration at 0.22 μ m of tissue homogenates is used in order to retain bacteria that might be present in tissues of moribund oysters. OsHV-1 appears as an ideal candidate due to its size and its envelop. As OsHV-1 is an enveloped virus, it may be assumed that it is fragile. High temperature, chemicals and UV [35,36] may destroy its lipid containing envelope. The virus envelope is needed for herpes virus entry in target cells. However, tissue homogenates might also contain other viruses or substances such as bacterial toxins able to induce mortality [37].

Real-time quantitative PCR analysis of intramuscularly injected oysters revealed the presence of high amounts of OsHV-1 DNA suggesting that active virus replication occurred in injected oyster. Moreover, TEM examination demonstrated the presence of herpes virus particles in mantle, adductor muscle and digestive gland of moribund oysters and confirmed real time quantitative PCR results. Virus particles demonstrated all the characteristics of OsHV-1 [11,16,38]. Moreover, numerous particles interpreted as L-particles were also detected in moribund oysters. Although L-particles were not previously reported in the existing body of literature on mollusc herpes viruses, such particles have been already described for vertebrate herpes viruses including herpes simplex virus 1 and 2, and pseudorabies virus [39-41]. L-particles are capsidless particles and lack the virus genome, but appear to contain all virus envelop and tegument proteins. Finally, in examined samples no virus particles morphologically related to virus families other than herpes viruses were observed by TEM.

Four postulates for the establishment a causal relationship between a pathogen and a disease have been first proposed by Koch in 1890 [42]. These postulates require that (i) the microorganism must be present in abundance in all organisms suffering of the disease, but absent from healthy organisms; (ii) the microorganism must be isolated from moribund organisms and cultivated in vitro; (iii) the cultivated microorganism should induce the development of the disease when introduced into a healthy organism; (iv) the organism must be isolated again from the new host organism infected and identified as being identical to the original infectious agent. Our results full filled at least three of the four Henlé-Koch postulates [43]. The virus was detected in large amounts in oysters collected in the field during mortality outbreaks (1st postulate). Although the virus was not cultivable in vitro at present due to the lack of susceptible cell lines, the injection of filtered (0.22 μ m) tissue homogenates prepared using naturally OsHV-1 infected spat induced high mortality rates in healthy oysters (3rd postulate). Finally, OsHV-1 was again detected based on real time quantitative PCR and TEM in injected oyster spat (4th postulate). Real time quantitative PCR analyses [26] showed that high amounts of virus DNA (approximately 1×10^5 DNA copies/ng of total DNA) were detected in the mantle of dying/dead oysters after intramuscular injection. As previously reported [16,26,34,44], the mantle appears as a target organ for OsHV-1 replication and may be recommended for epidemiological studies. Moreover, virus DNA amounts comparable to those quantified in the mantle of dying/dead individuals were detected in some surviving oysters at the end of the experiments. Such a result confirmed that all animals were infected after injection of tissue homogenates. In our study, an intramuscular route of infection was chosen to ensure that all experimental oysters were contaminated by the virus at the same time. Surviving oysters at the end of experiments (day 7 post-injection) may represent individuals collected before they died and/or be considered as less susceptible animals which developed the virus infection less rapidly. These results suggest that the susceptibility to the disease varies among oysters related to genetic diversity.

In this context, OsHV-1 may interpreted as the causative agent of oyster spat mortality noticed after filtered (0.22 μ m) tissue homogenate injections. In addition to transmitting OsHV-1 infection by intramuscular inoculation, the virus can be also waterborne transmitted to healthy oyster spat, via co-habitation of healthy oyster spat with experimentally infected individuals [45].

Previous experimental works have been able to strengthen a causal link particularly concerning *C. gigas* larval stages. It was established that OsHV-1 induced



larval mortalities [24,46,47]. To date, attempts to reproduce the virus infection in oyster spat have been inconclusive [25]. A first experimental data set indicated that OsHV-1 could be transmitted to healthy *C. gigas* spat through cohabitation with experimentally infected larvae when spat were kept in stressful conditions (Renault, unpublished data).

The intra-muscular injection of tissue homogenates prepared from infected oysters was used successfully in the present study. The capacity to reproduce the virus disease in the present study may be due to (i) the route of contamination (ii) the use of fresh infected oysters as the virus source and/or (iii) the use of a particular virus genotype (OsHV-1 µVar) presenting a high virulence. Although two ostreid herpesvirus 1 genotypes were previously characterized in France (OsHV-1 reference

genotype and OsHV-1 var genotype) [11], the presence of a third genotype, termed OsHV-1 μ Var, was reported in France in 2008 and 2009 in association with abnormal mortality outbreaks among French *C. gigas* [33]. Both OsHV-1 genotypes (reference and μ Var) were detected in association with mortality outbreaks in 2008. Otherwise, the data collected in 2009 during French oyster mortality outbreaks demonstrated only the genotype OsHV-1 μ Var detection. These results raise questions about the emergence and the virulence of OsHV-1 μ Var genotype. Moreover, L-particles were detected in moribund oysters and may be related to increased virulence. Although the exact role of herpes virus L-particles remains to be determined, some authors suggested that these particles supply functions which can boost successful initiation of the infectious process under adverse

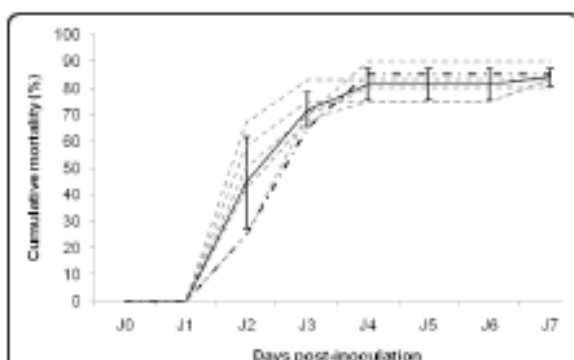


Figure 7 Reproducibility of mortality on Pacific oyster spat after injection of different infectious OsHV-1 homogenates made from experimentally infected animals. The dash line represent the mortality recorded after injection of the initial homogenate 2, which is made from naturally infected oyster spat collected on the field (South Brittany). The dotted lines corresponds to mortalities recorded in five consecutive transmission assays conducted using five different homogenates made from oyster spat dead previously in experimental conditions. The mean mortality is indicated by the solid line. Results are expressed as the percentage of cumulative mortality ($n = 10$). Standard deviation is represented by error bars.

conditions increasing infectivity and may have a role in vivo in enhancing reactivation from latency [39,48]. However, some experimental trials performed in 2008 with the reference like genotype, based on two ORF sequences characterization, showed that mortality could also be induced (data not shown). Further work is

needed to fully investigate possible infectivity and virulence differences between OsHV-1 genotypes.

However, the demonstration of a causal link between a pathogen and mortality outbreaks in the field is not only based on the possibility of reproducing the disease experimentally, but should take into account the idea that the cause of mortality outbreaks can also be a combination of factors. A causal link between OsHV-1 infections and oyster spat mortalities has been suggested in different epidemiological studies on summer oyster mortalities worldwide [25,49,50]. In France, this causal link has been highlighted through an epidemiological monitoring over several years conducted by the National Network for Surveillance and Monitoring of Mollusc Health (unpublished data), which is based on a passive surveillance and laid down on oyster mortality declarations by shellfish farmers.

Although the absence of bivalve cell lines does not allow to cultivate the virus in vitro [25], the protocol developed in the present study allows to produce tissue homogenates containing infective virus particles. Preliminary assays have showed that tissue homogenates could be stocked at 4°C for one month keeping infectivity. During this time of storage, real time quantitative PCR analyses showed that the virus DNA amounts did not vary (data not shown). However, real time quantitative PCR does not allow the quantification of infective virus particles, which are necessary to initiate the virus infection in host-cells [51]. Nevertheless, our protocol may allow to maintain sources of infective virus particles through repeated experimental infections of healthy

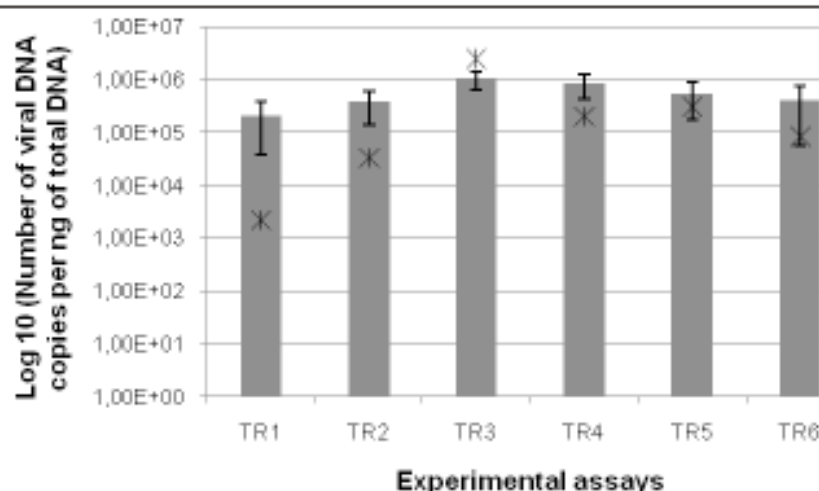


Figure 8 Average virus DNA amounts estimated in the mantle of oyster spat dead in five consecutive transmission assays conducted using five different homogenates made from oyster spat dead previously in experimental conditions. Stars represent virus DNA amounts of the different homogenates used in these consecutive transmission assays. Virus DNA amounts were quantified by real-time quantitative PCR. Standard deviation is represented by error bars.

oyster spat. However, care must be taken that the virus does not lose its infectivity through successive *in vivo* passages.

The present study described an experimental protocol allowing to prepare tissue homogenates containing infective OsHV-1 particles. Results showed that it is possible to maintain sources of infective virus and contributed to the set up of a reproducible model for studying the infectivity of OsHV-1 in *C. gigas* oysters in experimental conditions, which can be useful to obtain information including potential mechanisms of transmission, entry routes, virus stability and virus-host interactions.

Acknowledgements

The authors thank the Repamo team for providing oyster samples, Philippe Haffner for technical assistance, Abdelilah Benabdellmouna for his help concerning the UV treatment and Patrick Legall for providing healthy oysters.

Authors' contributions

This study is the result of a collective work. All authors conceived this study, and participated in its design. DSA, JFP and TR carried out the development of the protocol for the preparation of infectious tissue homogenates, with the help of others authors. DSA, NF, RM, TR and JFP carried out experimental pathology assays and molecular analysis. TR carried out the TEM examination. DSA performed the statistical analysis and drafted the manuscript with the help of TR. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

Competing interests

This work was exclusively supported by Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer). The authors declare that they have no competing interests.

Received: 29 July 2010 Accepted: 12 October 2010

Published: 7 February 2011

References

- The state of world fisheries and aquaculture 2008. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2009.
- Comps M [Martellia longeli n.sp., a parasite of the oyster *Crassostrea cucullata* Born]. *Martellia longeli* n.sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev Trav Inst des Pêches Marit* 1976, 40:347-349. (in French).
- Maurer D, Comps M, Hic E. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Halieutis* 1986, 15:309-317. (in French).
- Renault T, Le Duuff RM, Cochenne N, Maffart P. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - comparative study. *Revue Méd Vét* 1994, 145:735-742.
- Solteschnik P, Ropert M, Mazuric J, Fleury PG, Le Coz F. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 2007, 271:384-400.
- Le Duuff RM, Renault T. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J Gen Virol* 1999, 80:1317-1322.
- Davison AJ, Thus BL, Cheng N, Steven A, Watson MS, Cunningham C, Le Duuff RM, Renault T. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 2005, 86:61-63.
- Davison A, Eberle R, Ehlers B, Hayward G, McGeach D, Minson A, Pellett P, Roizman B, Studdert M, Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009, 154:171-177.
- Farley CA. Oyster Herpes-type virus. *Science* 1972, 178:759-760.
- Arzu I, Renault T, Lipart C. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: Demonstration of interspecies transmission. *Dis Aquat Organ* 2001, 46:1-6.
- Arzu I, Renault T, Lipart C, Davison AJ. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J Gen Virol* 2001, 82:655-670.
- Comps M, Cochenne N. A Herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. *J Invertebr Pathol* 1993, 62:201-203.
- Hine PM. Ultrastructural and ultracytochemical observations on Bonamia sp. in oysters (*Trochus chilensis*), with a consideration of organelle function. *Aquaculture* 1992, 107:175-183.
- Hine PM, Wesney B, Besant P. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Trochus chilensis* at ambient temperatures. *Dis Aquat Organ* 1998, 32:161-171.
- Nicolas JL, Comps M, Cochenne N. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull Eur As Fish Pathol* 1992, 12:11-13.
- Renault T, Cochenne N, Le Duuff RM, Chollet B. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull Eur As Fish Pathol* 1994, 14:64-66.
- Renault T, Le Duuff RM, Chollet B, Cochenne N, Girard A. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Organ* 2000, 42:173-183.
- Renault T, Lipart C, Arzu I. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *J Fish Dis* 2001, 24:369-376.
- Arzu I, Nicolas JL, Davison AJ, Renault T. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology* 2001, 290:342-349.
- Chang PH, Kuo ST, Lai SH, Yang HS, Ting YY, Hsu CL, Chen HC. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis Aquat Organ* 2005, 65:23-27.
- Hooper C, Hardy-Smith P, Handinger J. Ganglionitis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aust Vet J* 2007, 85:188-193.
- Tan J, Lancaster M, Hyatt A, van Driel R, Wong F, Warner S. Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglionitis and detection by transmission electron microscopy. *J Virol Methods* 2008, 149:338-341.
- Le Duuff RM, Renault T, Cochenne N. Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet Res* 1995, 26:526-529.
- Le Duuff RM, Renault T, Girard A. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* 1996, 24:149-157.
- Renault T, Novoa B. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat Living Resour* 2004, 173:97-409.
- Pépin JF, Riou A, Renault T. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 2008, 149:269-276.
- Renault T, Le Duuff RM, Lipart C, Desaut C. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J Virol Methods* 2000, 88:41-50.
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarius* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* 2009, 77:191-197.
- Gagnaire B, Gay M, Huvert A, Daniel JY, Saulnier D, Renault T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol* 2007, 84:92-102.
- Chan G, Guilbert L. Ultraviolet-B irradiated human cytomegalovirus induces placental syncytiotrophoblast apoptosis in a Toll-like receptor-2 and tumour necrosis factor- α dependent manner. *J Pathol* 2006, 210:111-120.
- Barbosa-Solomon V, Miossec L, Vazquez-Juarez R, Ascencio-Vale F, Renault T. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and *in situ* hybridisation. *J Virol Methods* 2004, 119:65-72.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, 25:169-193.
- Segarra A, Pépin JF, Arzu I, Morga B, Faury N, Renault T. Detection and description of a particular ostreid herpesvirus 1 genotype associated with

- massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 2010, **15**:92-9.
34. Sauvage C, Popin JF, Lapegue S, Boudry P, Renault T: Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res* 2009, **142**:181-187.
 35. Wolf MH, Schnieweis KE: UV inactivation of Herpes simplex viruses, types 1 and 2. *Zentralblatt Bakt. Orig. A* 1973, **223**:470-477. (in German).
 36. Plummer G, Lewis B: Thermal inactivation of Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus. *J. Bacteriol* 1965, **89**:671-674.
 37. Saulnier D, De Deder S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C: A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Eng.* 2010, **59**:787-798.
 38. Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, Chollet B, Maffat P: Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res* 1995, **26**:539-543.
 39. Dargatzis DA, Subak-Sharpe JH: The effect of herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. *Virology* 1997, **239**:378-388.
 40. McLauchlan J, Rixon FJ: Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alpha herpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J. Gen. Virol* 1992, **73**:269-276.
 41. Szilagyi JF, Cunningham C: Identification and characterization of a novel noninfectious herpes simplex virus-related particle. *J. Gen. Virol* 1991, **72**:661-668.
 42. Brock TD, Robert Abde: *A Life in Medicine and Bacteriology*. ASM Press Washington, DC, USA 2000.
 43. Evans JG: Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J. Biol. Med* 1976, **49**:175-195.
 44. Arzul I, Renault T, Thebaud A, Girard A: Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res* 2002, **84**:151-160.
 45. Schikorski D, Faury N, Popin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T: Experimental Ostreid herpesvirus 1 (OshV-1) infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* 2011, **155**:28-34.
 46. Le Deuff RM, Nicolas JL, Renault T, Cochenne N: Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 1994, **14**:69-72.
 47. Renault T, Arzul I: Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: Specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish Dis* 2001, **24**:161.
 48. McLauchlan J, Addison C, Craigie MC, Rixon FJ: Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology* 1992, **190**:682-688.
 49. Burge CA, Griffin FJ, Friedman CS: Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Org* 2006, **72**:31-43.
 50. Friedman CS, Eder RM, Stokes NA, Burge CA, Hargrove JS, Barber BJ, Elton RA, Burneson BM, Reece KS: Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org* 2005, **63**:33-41.
 51. Lyman MG, Enquist LW: Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton. *J. Virol* 2003, **83**:2058-2066.

doi:10.1186/1297-9716-42-27

Cite this article as: Schikorski et al.: Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* 2011 **42**:27.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens

Tristan Renault*, Gwenaëlle Tchaleu, Nicole Faury, Pierrick Moreau, Amélie Segarra, Valérie Barbosa-Solomieu and Sylvie Lapègue

Abstract

Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) is a DNA virus belonging to the *Malacoherpesviridae* family from the *Herpesvirales* order. OsHV-1 has been associated with mortality outbreaks in different bivalve species including the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*. Since 2008, massive mortality events have been reported among *C. gigas* in Europe in relation to the detection of a variant of OsHV-1, called μ Var. Since 2009, this variant has been mainly detected in France. These results raise questions about the emergence and the virulence of this variant. The search for association between specific virus genetic markers and clinical symptoms is of great interest and the characterization of the genetic variability of OsHV-1 specimens is an area of growing interest. Determination of nucleotide sequences of PCR-amplified virus DNA fragments has already been used to characterize OsHV-1 specimens and virus variants have thus been described. However, the virus DNA sequencing approach is time-consuming in the high-scale format. Identification and genotyping of highly polymorphic microsatellite loci appear as a suitable approach. The main objective of the present study was the development of a genotyping method in order to characterise clinical OsHV-1 specimens by targeting a particular microsatellite locus located in the ORF4 area. Genotyping results were compared to sequences already available. An excellent correlation was found between the detected genotypes and the corresponding sequences showing that the genotyping approach allowed an accurate discrimination between virus specimens.

Introduction

Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) is a DNA virus belonging to the *Malacoherpesviridae* family from the *Herpesvirales* order [1]. The virus has been purified from naturally infected *Crassostrea gigas* larvae [2] and its genome entirely sequenced [3]. The viral genome is a large linear duplex DNA molecule of 207 kb (GenBank accession number AY509253) that encodes at least 124 genes [3].

OsHV-1 has been associated with mortality outbreaks in different bivalve species including the Pacific cupped oyster, *C. gigas* [4,5]. Since 2008, massive mortality outbreaks have been reported among *C. gigas* spat in several farming areas in Europe [6-11] in relation to the detection of a newly described OsHV-1 variant called μ Var [7].

Although the reference type (a viral specimen collected in France in 1995 during a mortality event affecting *C. gigas* larvae, GenBank accession number AY509253) and the variant μ Var were detected in association with mortality outbreaks in 2008 in France, virus detection since 2009 has mainly concerned the μ Var variant [7,10,12]. These results raise questions about the emergence and the virulence of the μ Var variant. In this context, tools are needed in order to better describe OsHV-1 diversity in relation to virulence and geographical distribution. In light of the genetic diversity of OsHV-1, the search for associations between specific virus genetic markers and clinical symptoms is of great interest.

Determination of nucleotide sequences of PCR-amplified virus DNA fragments is the most accurate method for virus genotyping [13]. The DNA sequencing approach has been used to characterise OsHV-1 specimens and virus variants were thus reported [7,10,12,14-19]. The μ Var

* Correspondence: trrenault@ifremer.fr
Ifremer, Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, 17390 La Tremblade, France

Table 1 Collection of DNA extracted from *C. gigas* samples: geographical origins, virus DNA amounts and related GenBank accession numbers

Isolate code	Origin	Nature of sample	Viral DNA quantity (genome copies ng ⁻¹ of total DNA)	GenBank accession number
				C2/C6
1993/002	France	Larvae	5.15E + 04	JN80065
1994/005	France	< 1 year	6.54E + 03	JN80068
1994/006	France	< 1 year	4.04E + 04	JN80069
1994/011	France	< 1 year	6.60E + 04	JN80070
1994/012	France	Larvae	3.79E + 05	JN80071
1995/020	France	Larvae	1.35E + 05	JN80072
2005/001	France	< 1 year	7.05E + 04	JN80081
2005/005	France	< 1 year	1.23E + 05	JN80082
2005/012	France	< 1 year	9.96E + 04	JN80084
2006/005	France	Larvae	3.21E + 03	JN80087
2006/009	France	< 1 year	2.21E + 04	JN80088
2006/018	France	< 1 year	1.31E + 04	JN80090
2007/004	France	Larvae	1.08E + 06	JN80091
2007/026	France	< 1 year	1.41E + 04	JN80094
2007/028	France	< 1 year	1.00E + 04	JN80095
2007/029	France	< 1 year	1.04E + 05	JN80096
2007/030	France	< 1 year	1.21E + 04	JN80097
2007/034	France	1-2 years	1.18E + 04	JN80098
2007/035	France	< 1 year	8.98E + 03	JN80099
2008/017	France	< 1 year	4.30E + 02	JN80100
2008/019	France	1-2 years	8.48E + 06	JN80101
2008/021	France	Larvae	2.45E + 06	JN80102
2008/023	France	Adult	2.65E + 05	JN80103
2008/020	France	Larvae	1.66E + 03	-
2008/025	France	Adult	4.33E + 05	JN80104
2008/045	France	1-2 years	8.60E + 02	JN80107
2008/050	France	< 1 year	4.68E + 02	JN80108
2008/055	France	< 1 year	2.56E + 05	JN80109
2008/059	France	< 1 year	2.60E + 05	JN80110
2008/073	France	1-2 years	4.55E + 04	JN80111
2008/079	France	< 1 year	1.45E + 04	JN80112
2008/083	France	< 1 year	2.74E + 04	JN80113
2008/092	France	< 1 year	2.34E + 03	JN80114
2009/002	France	< 1 year	2.67E + 03	JN80115
2009/021	France	< 1 year	7.17E + 03	JN80116
2009/022	France	< 1 year	1.04E + 04	JN80117
2009/027	France	< 1 year	3.31E + 03	JN80118
2009/035	France	< 1 year	2.19E + 03	JN80119
2010/002	France	< 1 year	4.44E + 04	JN80120
2010/008	France	< 1 year	2.57E + 04	JN80121

Table 1 Collection of DNA extracted from *C. gigas* samples: geographical origins, virus DNA amounts and related GenBank accession numbers (Continued)

2010/012	France	< 1 year	1.58E + 05	JN800122
2010/013	France	< 1 year	1.61E + 05	JN800123
2010/021	France	< 1 year	8.38E + 03	JN800124
2010/023	France	< 1 year	6.42E + 05	JN800125
2010/026	France	< 1 year	5.98E + 05	JN800126
2007/07-CB2	USA	-	5.02E + 04	JN800128
2010/158-144	Japan	< 1 year	3.00E + 02	JN800133

variant [7] showed several differences in two genome areas when compared with the reference type (GenBank accession n° AY509523) and all these differences need to be observed to define a viral specimen as the μ Var variant.

Virus DNA sequencing is, however, time-consuming in the high-scale format. The identification and genotyping of highly polymorphic microsatellite areas from vertebrate herpesviruses appears as a suitable approach. Microsatellites have been reported from different herpesviruses including human cytomegalovirus and they have been used as molecular markers to define virus polymorphism [20-24].

Since the μ Var variant demonstrated a deletion of 12 bp in a microsatellite locus located up-stream of the ORF4 [7], the main objective of the present study was the development of a genotyping method. This method was used to characterise 47 clinical OsHV-1 specimens by targeting this microsatellite locus. DNA sequences already available were used to compare results obtained with both techniques. Sequencing and genotyping appeared to be equally useful to differentiate clinical OsHV-1 specimens.

Materials and methods

Oyster samples and C2/C6 sequences

Forty-seven samples of the Pacific cupped oyster, *C. gigas*, were selected in the present study in order to analyze them by genotyping. These included animals collected from 1993 to 2010 and covered different stages of development (larvae, spat and adults) (Table 1). Most of the samples (45) were collected in France during mortality outbreaks recorded by the national network for mollusc disease monitoring (Repamo, Ifremer) and were stored frozen at -20 °C. Two samples were of different geographical origins (Japan and USA) (Table 1).

Total nucleic acids were previously extracted from oyster samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) [25] and the quantity of viral DNA was estimated by real time PCR using the primer pair C9/C10 [26] for the purpose of a previous study [10]. Sequences of C2/C6 [27] PCR products from the sample

set were previously defined in the laboratory [10] and deposited in GenBank (Table 1).

Genotyping of a microsatellite locus

A microsatellite locus (called H10) was identified upstream of ORF4 based on an analysis of the whole genome of OshV-1 (GenBank accession n° AY509523) using the MsaFinder algorithm [28] and selected for genotyping. The number of repeat units of this trinucleotide microsatellite was 8 in the reference sequence (GenBank accession n° AY509523). This microsatellite (H10) was located in inverted repeated regions (4440–4463 positions and 178547–178547 positions). A primer pair (H10F/H10R) was designed with primer3 [29] (H10F: gtagtgcttgggcaaggt and H10R: ggcgcgattgtcagtttag). The expected size of the PCR product was 151 bp.

PCR was performed in 20 µL reaction volumes in a thermocycler (Applied Biosystems, Vilebon-sur-Yvette, France). Each reaction contained 11.76 µL dH₂O, 4.0 µL buffer 5X (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), 0.8 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL dNTP (2 mM), 0.18 µL of each primer (20 µM), and 0.08 µL GoTaq® DNA polymerase (5U/µL, Promega). PCR cycling conditions were 96 °C for 5 min; then 30 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s and 72 °C for 30 s; and finally a step of 72 °C for 2 min. PCR products were verified by electrophoresis (1% agarose gel).

PCR products were mixed with formamide and GeneScan 500-ROX size standard (Applied Biosystems)

respectively according to the manufacturer's recommendations (1.5 µL PCR products, 0.25 µL Rox size standard and 13.25 µL formamide). After 5 min denaturation followed by rapid cooling, PCR products were detected using an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and the fragment length was estimated through the GeneMapper 3.7 software.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed on C2/C6 [27] sequences [10] using 3 computational approaches. Information concerning genotyping results (length of the fragment) was included in specimen codes. For the first approach, a phylogenetic tree was created from sequence alignments using the Neighbor-joining (NJ) method [30]. The significance of the branching orders was assessed by bootstrap resampling of 1000 replicates. The second approach was based on phylogeny inference according to the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model [31]. Bootstrap data sets (1000 replicates) were generated. The Maximum Parsimony method was also used as the third approach. All approaches were implemented using the MEGA5 program [32].

Results

Polymorphism of C2/C6 PCR products

Comparing sequences of C2/C6 PCR products (Table 1) demonstrated a high polymorphism with 82 positions of

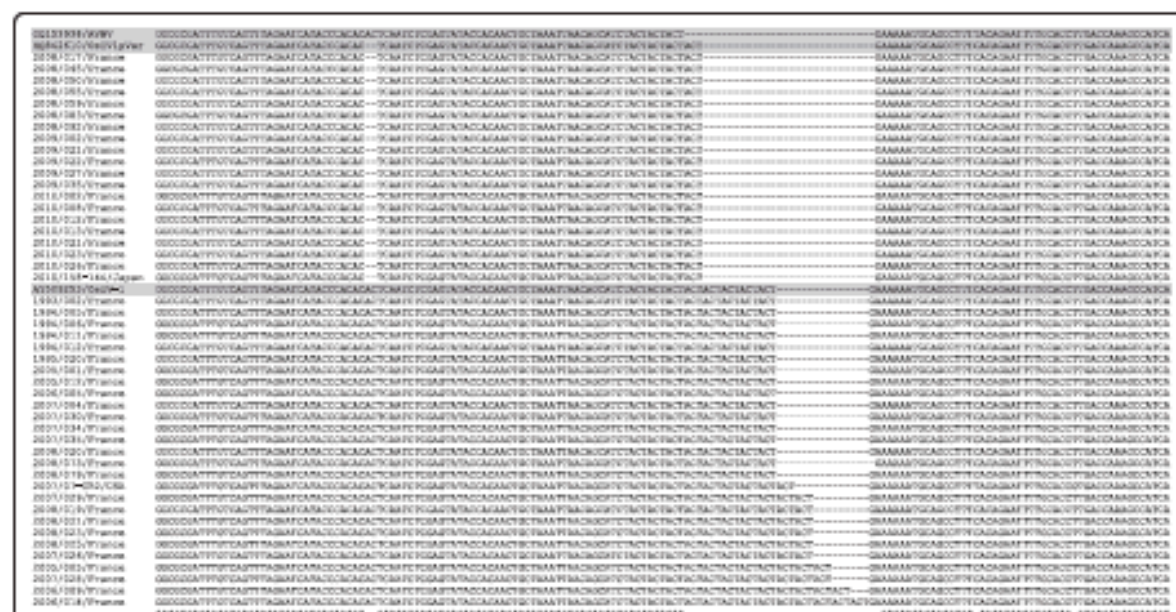


Figure 1 H10F/H10R sequence alignments between virus specimens. Partial C2/C6 (H10F/H10R) sequence alignments between virus specimens demonstrating variability at the microsatellite locus (H10) and mutation points. Locations of H10F/H10R primers are identified as underlined. OshV-1 reference type, the variant *plar* and *AWN* sequences are highlighted in grey. Stars represent identity at a particular nucleotide position.

a 482 nucleotide sequence (17%) showing a substitution/deletion/insertion defining 9 virus specimen types from the analysed samples (data not shown). H10F/H10R sequences revealed only a variability in the number of repeat units at the targeted short tandem repeat (H10) defining 7 virus specimen types from the analysed samples (Figure 1). An additional type corresponded to acute viral necrosis virus (AVNV) infecting cultured scallops, *Chlamys farrieri*, in China [33] (Figure 1). The minimum and maximum numbers of repeat units of the trinucleotide motif were 3 (AVNV) and 13 (2006/18/France), respectively (Figure 1).

Microsatellite genotyping

The 47 samples were genotyped for the H10 microsatellite locus which is located up-stream of the ORF4. In this region, a 13 bp deletion is one of the characteristics of the μ Var variant [7] and was hence chosen to achieve its interest as a diagnostic tool. Protocol optimisation focussed on the concentration of the labelled primers and the DNA in the PCR mix, but also the annealing temperature, time of elongation, and finally the dilution factor of the PCR

products in the formamide before fragment length analysis in the Genetic Analyzer.

Fragments were successfully amplified for the 47 samples (Figure 2). Seven different genotypes were detected corresponding to different fragment lengths estimated through the GeneMapper 3.7 software (135, 152, 155, 159, 161, 165 and 168 bp; Figure 2 and Table 2). Two genotypes (135 and 152) were more frequent with 20 and 16 of the samples, respectively (Table 2). Five more genotypes were detected in 11 samples (Table 2). When comparing the detected genotypes and the corresponding H10F/H10R sequences (Table 2), a good correlation was reported (Figure 3) showing that the genotypes identified by genotyping of the microsatellite reflected the sequences and allowed a clear discrimination between them. Moreover, sequencing showed that specimens presenting a fragment length estimated at 135 bp and 152 bp corresponded to the reference type and the μ Var variant, respectively. Although all the samples collected in France in 1993, 1994 and 1995 demonstrated a fragment length estimated at 152 bp, French samples collected in 2009 and 2010 showed a single pattern at

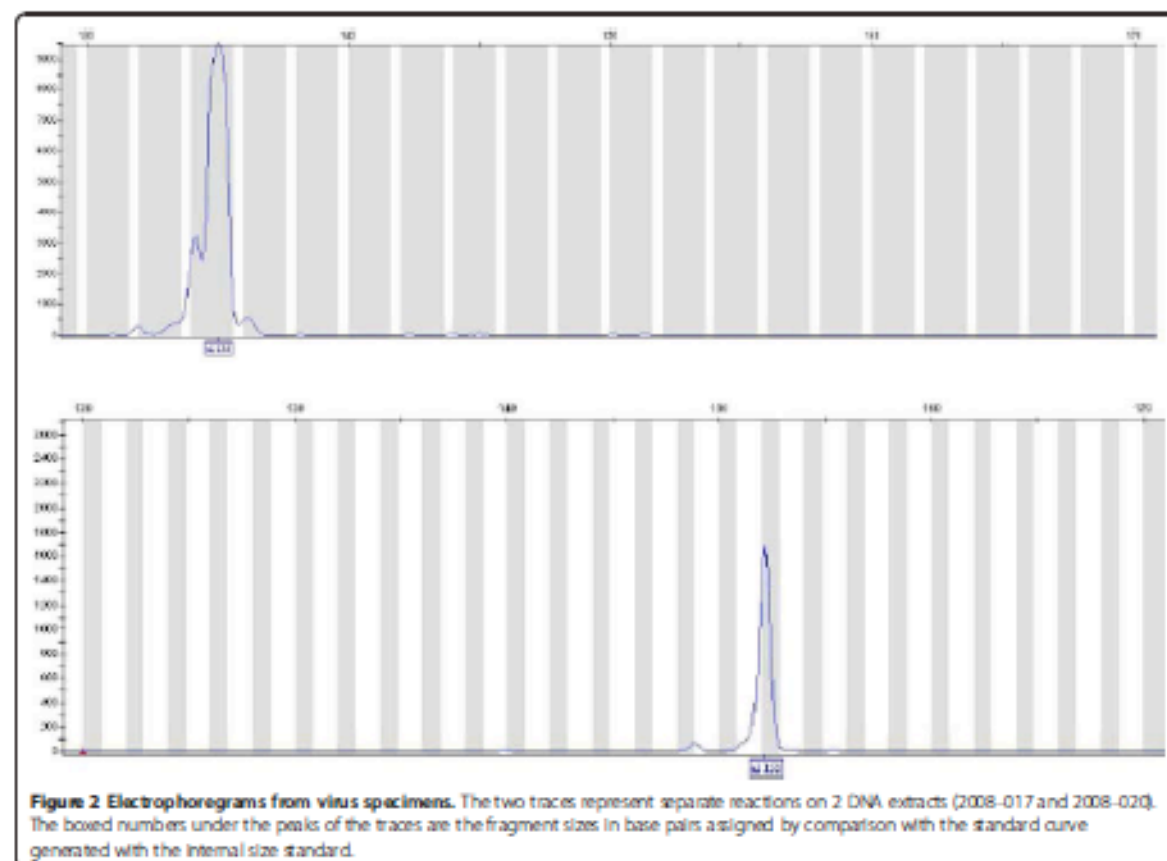


Table 2 Results obtained for each analysed specimen in terms of genotyping and DNA sequencing were grouped per year of collection

Specimen code	Genotyping	Number of repeats (CTA)	Detection frequency (%)	DNA sequencing
1993/002	152,19	8	34	151
1994/005	152,19	8	34	151
1994/006	152,18	8	34	151
1994/011	152,18	8	34	151
1994/012	152,19	8	34	151
1995/020	152,16	8	34	151
2005/001	152,23	8	34	151
2005/005	161,71	11	43	160
2005/012	152,27	8	34	151
2006/005	152,27	8	34	151
2006/009	164,88	12	2	168
2006/018	167,91	13	2	166
2007/004	152,35	8	34	151
2007/026	158,69	10	127	157
2007/028	161,82	11	43	160
2007/029	158,67	10	127	157
2007/030	152,18	8	34	151
2007/034	152,32	8	34	151
2007/035	152,32	8	34	151
2008/017	135,28	4	425	136
2008/019	158,96	10	127	157
2008/020	151,9	8	34	151
2008/021	158,72	10	127	157
2008/023	158,68	10	127	157
2008/025	158,65	10	127	157
2008/045	135,25	4	425	136
2008/050	135,18	4	425	136
2008/055	135,3	4	425	136
2008/059	135,17	4	425	136
2008/083	135,18	4	425	136
2008/092	135,21	4	425	136
2008/073	152,3	8	34	150
2008/079	152,32	8	34	151
2009/002	135,22	4	425	136
2009/021	135,14	4	425	136
2009/022	135,28	4	425	136
2009/027	135,29	4	425	136
2009/035	135,29	4	425	136
2010/002	135,29	4	425	136
2010/008	135,23	4	425	136
2010/012	135,24	4	425	136
2010/013	135,18	4	425	136

Table 2 Results obtained for each analysed specimen in terms of genotyping and DNA sequencing were grouped per year of collection (Continued)

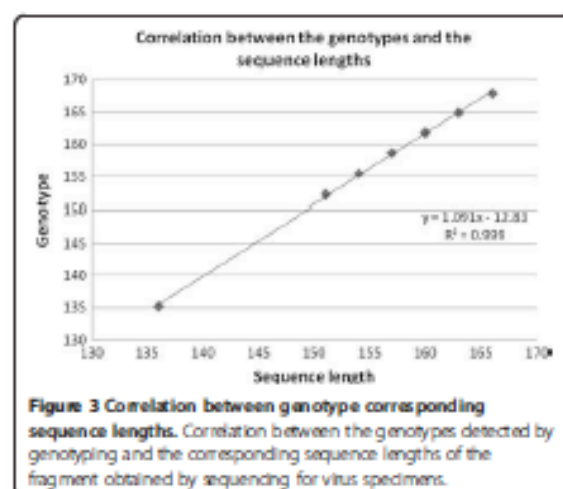
2010/021	135,31	4	425	136
2010/023	135,17	4	425	136
2010/026	135,24	4	425	136
2007/07 C82	155,47	9	2	154
2010/158-144	135,17	4	425	136

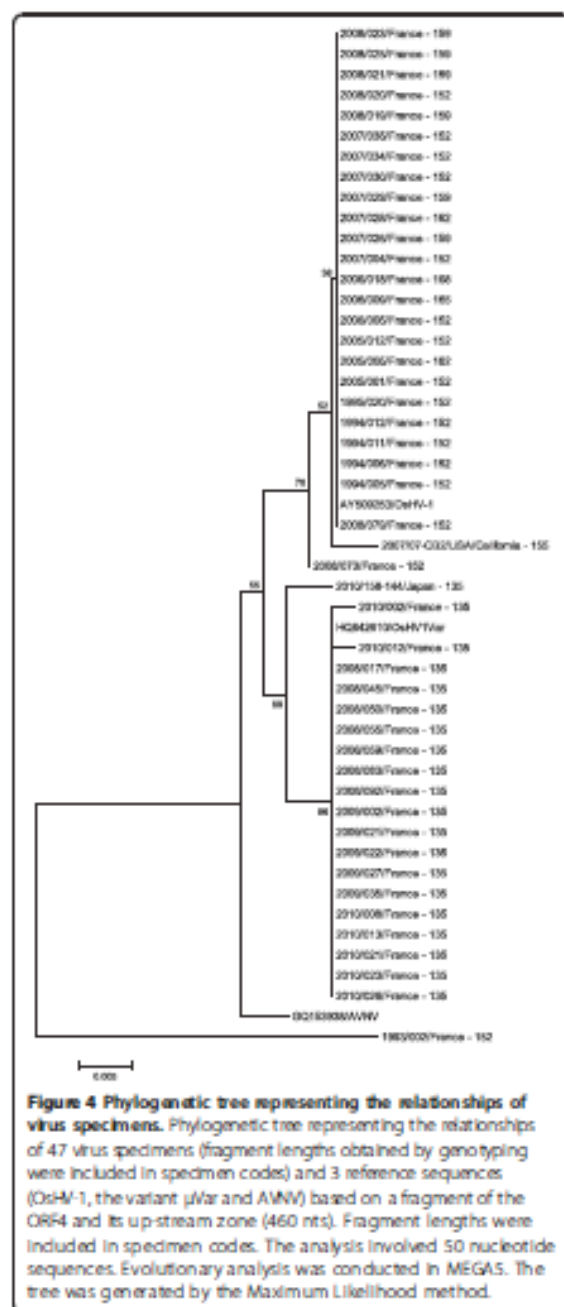
Although several genotypes were reported the same year in 2005, 2006, 2007 and 2008, a single one was noticed the other years.

135 bp. (Table 2). Different genotypes were detected each year for samples collected in France from 2005 to 2008 (Table 2).

Phylogenetic analysis

The phylogenetic trees built from the C2/C6 amplicon sequences (ORF4 and its related up stream area) using 3 different approaches allowed identification of 2 major groups from the 47 analysed virus specimens (Figure 4). A first group contained French specimens collected from 1993 to 2008 including the reference type (OsHV-1, GenBank n° accession AY509253) and the sample collected in the USA (California) in 2007. Although a main genotype (152 bp) was represented in this group, several other genotypes were also observed (155, 159, 162, 165 and 168 bp) (Figure 4). The second large group comprised French specimens collected from 2008 to 2010. It included the sequence of the μ Var variant deposited in GenBank (accession n° HQ842610) and the sequence of the sample from Japan (Figure 4). All samples grouped with the μ Var variant demonstrated a similar genotype at 135 bp (Figure 4). Two additional groups were defined. Each of them included a single member: a virus





specimen collected in France in 1993 on the one hand and AVNV on the other hand.

Discussion

This study reports for the first time the use of a microsatellite locus (H10) present in the OsHV-1 genome to analyze the virus diversity using 47 OsHV-1 specimens.

Microsatellites are short tandem repeats that occur in eukaryote, prokaryote, and also some virus genomes. They are highly DNA mutable sequences and represent hot spots of length mutation. Replication slippage errors are considered as the main cause of insertions and deletions at microsatellite loci. Microsatellites have thus been extensively used as molecular markers in numerous genetic diversity and genome mapping studies. Short microsatellite polymorphisms have already been used to describe genetic polymorphism of different vertebrate herpesviruses [20-24]. As an example, Deback et al. [24] used the microsatellite technology to determine genetic relationship between HSV-1 strains and showed that each patient was characterized by its own HSV-1 microsatellite haplotype.

The microsatellite selected in the present study (H10) is found in a noncoding region. This microsatellite was selected since numerous sequences are already available for this region demonstrating a high level of length polymorphism [7,10,12,19].

In the present study analysis of C2-C6 sequences [10] was first carried out to identify polymorphisms among the selected OsHV-1 specimens and to prepare genotyping. The ORF4 area with 82 substitutions/deletions/insertions appeared highly polymorphic presenting variability in the number of repeat units at the targeted short tandem repeat and a variety of point mutations defining 9 virus types. Sequence alignment allowed identification of polymorphisms among virus specimens interpreted as being the reference type (GenBank AY509253). Several French samples collected from 1993 to 2008 demonstrated 100% identity with the reference type and as such could be identified as OsHV-1 [3]. Other samples collected in France from 2003 to 2008 showed some differences in comparison with the reference type. Finally, a French virus specimen collected in 1993 presented high homologies with the variant OsHV-1 Var [14,16,34]. These results showed that different OsHV-1 variants are represented in the sample set selected for the present study. Acute Viral Necrosis Virus (AVNV) [33] was included in comparing C2-C6 PCR product sequences since its complete genome is available in GenBank and it presents the shorter sequence for the H10 microsatellite. The number of sequences from countries other than France used in this study was low. Complementary analysis of additional specimens is ongoing in the laboratory and detailed comparison of sequences would present further epidemiological information on OsHV-1.

Among the 47 samples analysed, 7 different genotypes were detected with 2 more frequent ones. They respectively included specimens interpreted as the reference type and the μ Var variant. Five more genotypes were also detected. When comparing the genotypes detected and the corresponding C2/C6 sequences, a good correlation was

reported showing that the detected genotypes reflected the sequences and allowed a clear discrimination between specimens. However, the number of virus specimen types (9) obtained by sequencing of C2-C6 PCR products remains higher than the number of genotypes defined by genotyping (7). Although analysis of variation in length through genotyping offers a first order of discrimination, sequencing of alleles and viral length variants adds a second level. Sequencing is a necessary step to obtain maximum resolution between viral specimens also revealing SNP.

The polymorphism reported for the selected microsatellite in the present study confirms the interest of such analysis to describe OsHV-1 genome diversity. Moreover, a multiplex genotyping based on analysis of several microsatellites needs to be developed for OsHV-1. The *in silico* analysis of the OsHV-1 genome using the MsaFinder algorithm demonstrated the presence of 12 short repeat sites including 4 mononucleotide units, 5 dinucleotide repeats, and 3 trinucleotide repeats (data not shown). Most of the identified microsatellites were localized in noncoding parts of the OsHV-1 genome, except for 3 of them located in ORF 66, 77 and 106, respectively. The number of repeat units of dinucleotide or trinucleotide microsatellites was 5 or 8. The longest mononucleotide sequence was 18 bases and 3 microsatellites were located in inverted repeated regions. As most of OsHV-1 repeats are found in noncoding areas, they can be considered as evolutionarily neutral or nearly so and therefore as suitable markers for epidemiology studies. Such a technique targeting several microsatellite loci may provide a rapid and accurate tool that can be used to compare OsHV-1 specimens and to study the epidemiology of viral infections. Finally, polymorphism of microsatellites may also be used to study viral strain virulence. Perdue et al. [35] reported that the increased virulence of a particular strain of the avian influenza virus is related to the increase in the length of a microsatellite at the hemagglutinin cleavage site.

In conclusion, genotyping based on microsatellite loci appears as a powerful tool to study OsHV-1 polymorphism and can offer a first level of discrimination between specimens in order to select best candidates for complete genome sequencing. Furthermore comparative diversity studies between the host, *Crassostrea gigas*, and OsHV-1 can be easily performed using oyster microsatellite markers [36] and to characterize coevolution in this recently introduced oyster species in Europe [37].

Competing interests

This work was supported by Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer). The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This study is the result of a collective work. TR and SL conceived this study, and participated in its design. TR, GT and SL carried out the design of the

protocol, with the help of the other authors. GT, NF, PM and AS carried out sample analyses. TR and SL drafted the manuscript. VBS participated in the discussion and modification of the manuscript. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was partially funded through the EU project Aquagenet (SOE2/P1/E287).

Received: 14 April 2013 Accepted: 19 December 2013

Published: 10 January 2014

References

1. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AM, Pollett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E: The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009, **154**:171–177.
2. Le Duuff RM, Renault T: Purification and partial genome characterization of a herpeslike virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J Gen Virol* 1999, **80**:1317–1322.
3. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Duuff RM, Renault T: A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 2005, **86**:41–53.
4. Renault T, Le Duuff RM, Cochenne N, Malfart P: Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. *Rev Med Vet* 1994, **145**:735–742.
5. Garcia C, Thibault A, Dégremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, Chollet B, François C, Joly JP, Ferrand S, Kerdudou N, Renault T: OsHV-1 detection and relationship with *C. gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vir Res* 2011, **121**:73–84.
6. EFSA: Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *EFSA J* 2010, **8**:1894–1954.
7. Segarra A, Pèpin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T: Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vir Res* 2010, **153**:92–95.
8. Lynch SA, Carlson J, Reilly AD, Cotter E, Culloty SC: A previously undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 2012, **139**:1526–1532.
9. Peeler JE, Reese RA, Chedoke DL, Geoghegan F, Power A, Trush MA: Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in the Republic of Ireland in 2009. *Prev Vet Med* 2012, **105**:136–143.
10. Renault T, Morga B, Faury N, Pèpin JF, Segarra A, Webb S: Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* 2012, **86**:5942–5947.
11. Roque A, Quirós N, Andree KB, Lacuesta B, Bandaloussi L, Galin I, Rodgers CJ, Furones MD: First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 2012, **324**:303–306.
12. Martonot C, Odier E, Travalin E, Molis JP, Housin M: Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Vir Res* 2011, **160**:25–31.
13. Norberg P, Bergström T, Ujvaly J: Genotyping of clinical Herpes Simplex Virus type 1 isolates by use of restriction enzymes. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:4511–4514.
14. Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ, Renault T: French scallops: a new host for ostreid herpesvirus 1. *Virology* 2001, **290**:342–349.
15. Arzul I, Renault T, Lipart C, Davison AJ: Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J Gen Virol* 2001, **82**:865–870.
16. Renault T, Lipart C, Arzul I: A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *J Fish Dis* 2001, **24**:369–376.
17. Friedman CS, Essex RM, Stokes NA, Burge CA, Hargrove JS, Barber BJ, Eston RA, Burneson BM, Reece KS: Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis Aquat Organ* 2005, **63**:33–41.
18. Moss JA, Burneson BM, Cordis JE, Duncan CF, Brown GD, Wang A, Wu X, Reece KS: Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: Implications for non-native oyster introduction in Chesapeake Bay. *Dis Aquat Organ* 2007, **77**:207–233.

19. Shimahara Y, Kurita I, Kiyu I, Nishioka T, Yuasa K, Kiyawa M, Kamaishi T, Osako N: Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OshV-1) variants in Japan. *Fish Pathol* 2012, **47**:129–136.
20. Davis CL, Field D, Metzger D, Salz R, Morin PA, Smith IL, Spector SA, Willis C: Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *J Virol* 1999, **73**:6265–6270.
21. Walker A, Petheram SJ, Ballard L, Murphy JR, Demmler GJ, Bale JF: Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2001, **39**:2219–2226.
22. Picone O, Costa JM, Ville Y, Rouzioux C, Lenzo-Ville M: Human cytomegalovirus (HCMV) short tandem repeats analysis in congenital infection. *J Clin Virol* 2005, **3**:254–256.
23. Deback C, Boutolleau D, Depienne C, Luyt CE, Bonnafant P, Gautheret-Dejean A, Garique I, Agut H: Utilization of microsatellite polymorphism for differentiating herpes simplex virus type 1 strains. *J Clin Microbiol* 2008, **47**:533–540.
24. Deback C, Luyt CE, Lepinasse S, Depienne C, Boutolleau D, Chastre J, Agut H: Microsatellite analysis of HSV-1 isolates: from oropharynx reactivation toward lung infection in patients undergoing mechanical ventilation. *J Clin Virol* 2010, **47**:313–320.
25. Qiagen QIAmp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2nd edition. D-46724 Hilden, Germany: Qiagen GmbH; 2007.
26. Pélissier JF, Riou A, Renault T: Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus A in oyster samples by real-time PCR. *J Virol Methods* 2008, **149**:269–276.
27. Renault T, Azul I: Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J Fish Dis* 2001, **24**:161–167.
28. Thurston M, Field D: MsaFinder: detection and characterisation of microsatellites. (<http://www.bioinformatics.org/ftp/pub/msafinder/README.txt>)
29. Rozon S, Skolitsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz S, Misener S. Totowa, NJ: Humana Press; 2000:365–386.
30. Saltou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406–425.
31. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
32. Tamura KM, Nei M: Estimation of the number substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993, **10**:512–526.
33. Ren W, Chen H, Renault T, Cai Y, Bai C, Wang C, Huang J: Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Viral J* 2013, **10**:110–116.
34. Renault T, Liport C, Azul I: A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis Aquat Organ* 2001, **45**:1–7.
35. Pordue ML, Garcia D, Sonne D, Fraire M: Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 1997, **49**:173–186.
36. Li R, Li Q, Comette C, Dégremont L, Lapégue S: Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. *Aquaculture* 2010, **310**:234–239.
37. Rohlfisch A, Biemo N, Boudry P, Humeau S, Comette C, Lapégue S: Population genomics shed light on the demographic and adaptive histories of European invasion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evol Appl* 2013, **6**:1064–1078.

doi:10.1186/1297-9716-45-3

Cite this article as: Renault et al.: Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens. *Veterinary Research* 2014 **45**:3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Table des illustrations

Figures :

- ✓ Figure 1. Production mondiale (sans la production chinoise) de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 2. Schéma des interactions environnement-hôte-agent pathogène
- ✓ Figure 3. Parcs à Huîtres dans l'Ile de Ré
- ✓ Figure 4. Evolution de la qualité microbiologique des eaux conchylicoles en France de 1991 à 2012. Mesure effectuées pour les bivalves non fouisseurs, moyenne glissante sur trois années calendaires.
- ✓ Figure 5. Production d'huîtres en France au cours du XXème siècle
- ✓ Figure 6. Introduction de *Crassostrea gigas* dans le monde
- ✓ Figure 7. Bilan France Agrimer 2011, Filière Pêche et Aquaculture
- ✓ Figure 8. Position proposée du groupe des herpesvirus d'invertébrés au sein de l'arbre phylogénétique des herpesvirus
- ✓ Figure 9. Particules virales des herpesvirus
- ✓ Figure 10. Organisation générale du génome de l'ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)
- ✓ Figure 11. Diversité du virus OsHV-1
- ✓ Figure 12. Principaux pays producteurs de *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 13. Production par espèce : 4 480 000 tonnes en 2010 (+4.1 % par rapport à 2009) et répartition mondiale
- ✓ Figure 14. Cycle biologique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 15. Cycle de production de *Crassostrea gigas*

- ✓ Figure 16. Cycle de vie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 17. Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 18. Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Figure 19. Système circulatoire simplifié chez les mollusques bivalves
- ✓ Figure 20. (a) Rôle et expression de gènes clés dans les grandes voies de réponse aux conditions de stress chez *Crassostrea gigas*. (b) Diagramme de Venn des gènes communs et uniques exprimés en réponse à la température, la salinité, exposition à l'air et le stress de métaux lourds (zinc, le cadmium, le cuivre, le plomb et le mercure), montrant le chevauchement des réponses. (c) Nombre de gènes avec et sans paralogues détectables montrent que les gènes répondant au stress sont plus susceptibles d'avoir paralogues ($P < 1 \times 10^{-10}$; χ^2 test).
- ✓ Figure 21. Modèle général d'ontogénèse hémostatique chez les mollusques bivalves
- ✓ Figure 22. Modèle général d'ontogénèse hémostatique chez les mollusques bivalves
- ✓ Figure 23: hyalinocyte d'huître creuse. (a) Observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) (G * 600); (b) Observation au microscope électronique à transmission
- ✓ Figure 24: granulocyte d'huître creuse. (a) Observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) (G * 600); (b) Observation au microscope électronique à transmission
- ✓ Figure 25: Mécanisme général de la phagocytose et de l'encapsulation
- ✓ Figure 26: Activation du système phénoloxydase (ProPO) chez les invertébrés
- ✓ Figure 27. Description des voies de l'apoptose, de l'autophagie et de la nécrose
- ✓ Figure 28. Illustration, en microscopie électronique, des différences morphologiques entre apoptose, nécrose et autophagie par comparaison à une cellule saine (A). L'apoptose (C), est caractérisée par une condensation nucléaire avec une fragmentation de L'ADN et un

clivage de celui-ci. Au contraire, la nécrose cellulaire (D) est caractérisée par une vacuolisation cytoplasmique. L'autophagie (B) est différente avec la formation de vésicules à double membrane (les autophagosomes).

- ✓ Figure 29. Représentation schématique des trois types d'autophagie. (a) L'autophagie dépendante de protéines chaperonnes. (b) La microautophagie (c) La macroautophagie.
- ✓ Figure 30. ATG : éléments essentiels pour la formation des autophagosomes
- ✓ Figure 31. Mécanismes d'échappement et de détournement de l'autophagie par des agents pathogènes
- ✓ Figure 32. Interactions de différents herpèsvirus avec la machinerie de l'autophagie
- ✓ Figure 33. Schéma des réponses des organismes aux effets délétères dus à l'exposition à des polluants
- ✓ Figure 34. Enchaînement des effets toxiques sur les différents niveaux d'organisation biologique

Tableaux :

- ✓ Tableau 1. Classification de l’Huître creuse, *Crassostrea gigas*
- ✓ Tableau 2. Types de facteurs environnementaux
- ✓ Tableau 3. Les 41 substances surveillées dans le cadre de la DCE suivant les seuils NQE : norme de qualité environnementale
- ✓ Tableau 4. Effets des pesticides sur les mécanismes de défense immunitaire chez l’Huître creuse, *Crassostrea gigas*

Protocoles

Extraction d'ADN: Kit QIamp DNA (Qiagen)

Prise d'essai:

- Déposer la prise d'essai ((tissus (mg), eau (µL)) dans un tube Eppendorf 1.5 mL (RNA-DNase free) sur glace.
- Peser et noter la masse de prise d'essai (20 à 40 mg)

Lyse des cellules :

- Ajouter **180 µL** de buffer **ATL**
- Ajouter **20 µL** de **Proteinase K**
- Vortex quelques secondes
- Incuber à **56°C** durant **3h** ou toute la nuit sous agitation(**700 rpm**)
- Centrifuger **1000g, 1min à TA**
- Ajouter **200 µL** de buffer **AL**
- Vortex 15 secondes
- Incuber **10 min à 70°C (700 rpm)**
- Centrifuger **1000g, 1min à TA**
- Ajouter **200 µL** d'alcool absolu (100°) froid
- Vortex 15 secondes – Ne pas centrifuger
- Charger sur la colonne Qiagen sans toucher le bord du tube
- Centrifuger **6000g (rcf), 1 min à TA**
- Récupérer la colonne et placer la dans un tube **2 mL** neuf

Lavage et élution de l'ADN :

- Déposer **500 µL** de tampon **AW1 (wash1)** au-dessus de la membrane
- Centrifuger **6000g (rcf) pdt 1 min à TA**
- Récupérer la colonne et placer la dans un tube **2 mL** neuf
- Déposer **500 µL** de tampon **AW2 (wash2)** au-dessus de la membrane
- Centrifuger **20 000g, 3 min à TA**
- Récupérer la colonne et placer la dans un tube **1.5 mL** neuf identifié avec le nom de l'échantillon
- Déposer **100 µL** (50µL pour solution virale à tester ou eau) de **tp AE** au-dessus de la membrane
- Incuber **5 min à TA**
- Centrifuger **6000g (rcf), 2 min à TA**
- Doser ADN au nanodrop et vérifier le rapport 260/280 nm est > ou = à 1.6 – 1.9

Pour la PCR q la quantité d'ADN doit être entre 5 et 50 ng pour 5 µL

AW1 (ajouter 125 mL d'éthanol 100 pour la mise en service)

AW2 (ajouter 160 mL d'éthanol 100 pour la mise en service)

Marquage au Monoazide Propidium (PMA)

Fournisseur Interchim ref : FP-BZ9340 de Fluo Probe

- Solubilité et préparation de la solution stock

Tube de 1 mg repris avec 100 μL de DMSO à 20% : soit solution de PMA à +/- 20 mM. Ajouter les 100 μL , ne pas essayer de mélanger à la pipette, vortexer, attendre, vortexer à nouveau. Préserver de la lumière.

Conserver au réfrigérateur pour une utilisation rapide sinon congeler (possibilité de stocker au moins 6 mois à -20°C)

- Photoactivation

Préparer les échantillons contenant du PMA avec des tubes clairs pour permettre une meilleure photosensibilisation.

Préparation échantillon à partir de PMA 20 mM

Conc finale	Vol suspension μL	Eau de mer μL	PMA 20 mM μL	Volume total μL
0 μM	280	20	0	300
500 μM	280	12.5	7.5	300

Vortexer rapidement

Mise en contact du PMA : 10 mn d'agitation à l'abri de la lumière à 600 rpm

Exposer au Phast blue pendant 10 mn.

Procéder à l'extraction de l'ADN en protégeant de la lumière pendant la lyse

Extraction de l'ADN Kit QiAmp DNA Qiagen

Prise d'essai pour extraction avec le kit. Avec PMA 20 mM : 162 μL (extraction sur 150 μL de suspension)

Procéder à l'extraction selon le protocole classique

Extraction des ARN au Trizol

A partir d'hémocytes en suspension :

- Culotter les hémocytes par centrifugation (10 min à 4°C à 400g)
- Retirer le surnageant
- Reprendre le culot d'hémocytes avec 1 mL de Trizol
- Extraire à 4°C

Sur tissus :

- Prélever entre 50 et 100 mg de tissus
- Broyer au piston pellet dans 200 µL de Trizol
- Ajouter 800 µL de Trizol après broyage (1 mL au total)

NB : après extraction (tissus) faire une centrifugation des lysats pour se débarrasser des débris à 3000g, 15 min.

Séparation :

- Récupérer le lysat dans un tube Dnase Rnase Free
- Ajouter un mélange chloroforme alcool isoamylique : 1/5 du volume de Trizol (200 µL)
- Vortexer 15 secondes puis laisser reposer 2-3 min à température ambiante
- Centrifuger 15 min à 4°C à 12 000g
- Récupérer le surnageant dans un tube Dnase Rnase Free

Précipitation :

- Ajouter de l'isopropanol froid (4°C) : ½ du volume de Trizol (500 µL) et retourner délicatement
- Incuber 10 min à température ambiante
- Centrifuger 10 min à 4°C à 12 000g

Lavage :

- Rejeter le surnageant, laver le culot avec 1 mL d'éthanol à 75%
- Centrifuger 5 min, 4°C à 7500g
- Rejeter le surnageant
- Eliminer les dernières gouttes d'éthanol avec un cône stérile et sécher sous la hotte
- Remettre en suspension dans 22µL H₂O (milliQ)

Lecture au nanodrop (1.5µL) et congeler les échantillons à -80°C après analyse sur gel (après traitement à la Dnase)

Traitement avec Dnase Ambion des ARN extraits au Trizol

But : Elimination de l'ADN génomique.

Tube 200 µL Dnase Rnase free

- Tampon 10X 5 µL
- Dnase (2U) 2 µL 2U (1µ) pour 10 µg d'ARN dans 50 µL final
- ARN* 22 µL (adapter la quantité)
- H₂O qsq pour avoir 50 µL final
- Incuber à 37°C pendant 45 min.

*Il faut diluer les échantillons très concentrés (tissus).

Elimination de la Dnase et séparation :

- Récupérer les 50 µL ARN traités Dnase dans un tube 1,5 mL Dnase Rnase free
- Ajouter 200 µL de Trizol
- Mélanger
- Ajouter un mélange chloroforme alcool isoamylique : 1/5 du volume de Trizol (40 µL)
- Vortexer 15 sec puis laissé reposer 2-3 min à température ambiante
- Centrifuger 15 min à 4°C à 12 000 g
- Récupérer le surnageant dans un tube Dnase Rnase free

Précipitation :

- Ajouter de l'isopropanol froid (4°C) : 2 fois le volume de Trizol (400 µL)
- Incuber 10 min à température ambiante
- Centrifuger 10 min à 4°C à 12 000 g

Lavage :

- Rejeter le surnageant, laver le culot avec 400 µL d'éthanol à 75%
- Centrifuger 5 min, 4°C à 7 500g
- Rejeter le surnageant
- Eliminer les dernières gouttes d'éthanol avec un cône stérile et sécher sous la hotte
- Remettre en suspension dans 22 µL H₂O (milliQ)

Lecture au nanodrop (1,5 µL) et congeler les échantillons à -80°C (après contrôle sur gel d'agarose(après traitement à la Dnase)).

Effectuer la NoRT pour vérifier qu'il n'y a plus d'ADN : si ok dilution des ARN au 1/30.

Extraction des protéines

Sur tissus :

- Prélever environ 20 mg de tissus
- Tissus dans 100 µL de Cell extraction buffer (solution fraîche)*, broyer avec un piston pellet.
- Vortex et incubation sur glace 30 min
- Centrifugation à 13 000rpm (mettre en g) à 4°C pendant 10 min pour récupérer le surnageant
- Rajouter du tampon Laemmli 2X autant que pour le cell extraction buffer (100µL)
- Chauffage à 100°C pendant 5 min

* Cell extraction buffer (invitrogen)

Formule du tampon d'extraction:

- 10 mM Tris, pH 7.4
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 1 mM NaF
- 20 mM Na₄P₂O₇
- 2 mM Na₃VO₄
- 1% Triton X-100
- 10% glycerol
- 0.1% SDS
- 0.5% deoxycholate

Ce tampon d'extraction doit être complété par 1 mM de PMSF (non inclus) et des inhibiteurs de protéases (inhibiteur de protéases (lifetechnologies) non inclus) juste avant l'utilisation.

- Pour le PMSF, faire un stock 0,3 M dans le DMSO, et ajouter un volume suffisant pour obtenir une concentration finale de 1 mM (par exemple, 17 µL par extraction de cellules de 5 ml tampon). Le PMSF est très instable et doit être ajouté juste avant utilisation.
- Pour l'ajout de cocktail d'inhibiteurs de protéases : Sigma Cat. # P-2714 reconstitué selon les instructions du fabricant, 250 µl par 5 ml un tampon d'extraction. La stabilité des inhibiteurs de protéases est de 24 heures à 4 °C dans le tampon.

SDS PAGE et Western blot

La technique SDS/PAGE (Sodium-dodecyl-sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis) a été utilisée pour séparer les protéines des échantillons. Le SDS rompt les liaisons hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes et élimine les structures secondaires et tertiaires des protéines.

Gel de séparation

Pour 1 gel	15%	12%	10%	9%	7%
H2O	2,3 ml	3,3 mL	4	4,3	5
Polyacrylamide bisacrylamide (30%-0,8%)	5 ml	4mL	3,3	3	2,3
Tris 1,5M ph 8,8	2,5 ml	2,5 mL	2,5	2,5	2,5
SDS 20%	0,05 ml	50 µL	0,05	0,05	0,05
APS 10%	0,1 ml	100 µL	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,004 ml	4 µL	0,004	0,004	0,004

Gel de concentration

Pour 1 gel	5%	5%
H2O	3,4 ml	3,4 ml
Polyacrylamide bisacrylamide (30%-0,8%)	0,83 ml	830 µL
Tris 1M ph 6,8	0,63 ml	630 µL
SDS 20%	0,025 ml	25 µL
APS 10%	0,05 ml	50 µL
TEMED	0,005 ml	5 µL

Les échantillons sont mélangés avec un tampon de charge appelé tampon de Laemmli (comportant du β -mercaptoéthanol), puis chauffés à 95°C pour permettre la dénaturation des protéines.

Le Western Blot est une technique qui après transfert des protéines séparées par SDS/PAGE sur une membrane de les détecter par chemiluminescence ou autoradiographie. Au cours de cette thèse, les protéines séparées par SDS/PAGE ont été transférées sur des membranes PVDF (polyvinylidène fluorure; Hybond-p de Amersham Biosciences). Les membranes PVDF doivent être activées par un bain de méthanol (100%) avant utilisation. Pour le transfert, le gel SDS/PAGE est placé contre une membrane de transfert, puis emprisonné dans un sandwich de papier Whatman, et immergé dans un tampon de transfert. Un courant électrique permet le transfert des protéines du gel vers la membrane grâce à la charge négative des protéines. L'étape de transfert, dit liquide, est réalisée dans un conteneur spécifique (Mini Protean-II, BioRad). En général, le transfert se déroule pendant 1h en exerçant un courant électrique constant de 100 V (ou sur la nuit à 4°C à 30V).

La membrane est ensuite soumise à l'étape de marquage immunologique. Dans un premier temps, afin de bloquer les sites non spécifiques des protéines, la membrane est incubée dans une solution dite de blocage, contenant du PBS-Tween 20 (0,05%) supplémenté de 0,1 à 5% de lait en poudre ou 5% d'albumine de sérum de veau (BSA), en fonction des protéines étudiées. Ensuite, la membrane est incubée avec un anticorps primaire spécifique d'une protéine d'intérêt, dilué suivant les recommandations du fabricant dans la solution de blocage pendant une durée qui peut varier de 1 h jusqu'à 24 h, à température ambiante ou à 4°C. Après plusieurs lavages successifs avec une solution de PBS-Tween (0,05%), la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, spécifique de l'anticorps primaire utilisé, dilué suivant les recommandations du fabricant dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Après une étape finale de lavage, la membrane est révélée à l'aide d'une solution de détection (ECL Western blotting reagent, Amersham Biosciences ou SuperSignal West Pico, Thermo Scientific) suivant les recommandations des fabricants. La lumière émise suite à la réaction de chemiluminescence est détectée et analysée par le système LAS-3000 (Fujifilm).

Cytométrie en flux

La cytométrie de flux consiste à étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules (cellules) entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant. Ces informations sont obtenues soit directement (autofluorescence des cellules), soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes (marqueurs cellulaires). Un cytomètre de flux est constitué d'une composante fluidique, d'une composante optique et d'une composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique (Cram, 2002). L'appareil utilisé dans cette étude est un EPICS XL 4 (Beckman Coulter).

Protocoles utilisés

- ✓ Pour mesurer la mortalité hémoducytaire, 200 µL d'hémolymphc ont été incubés avec 10 µL d'iodure de propidium pendant 30 min sur glace à l'obscurité.
- ✓ Les activités estérases non spécifiques ont été recherchées dans 200 µL d'hémolymphc après incubation de 30 min à l'obscurité, à température ambiante avec 1 µL de FDA (diacétate de fluorescéine).
- ✓ Le calcium intra-cytoplasmique a été détecté dans 200 µL d'hémolymphc additionnés de 1 µL Fluo-4 AM à 5 µM (incubation de 1h 30 min à l'obscurité à température ambiante).
- ✓ La présence et le nombre de lysosomes ont été mesurés dans 200 µL d'hémolymphc additionnés de 1 µL LysoTracker (Invitrogen : LysoTracker® Green DND-26) à 1 mM (incubation 2h à l'obscurité à température ambiante).
- ✓ L'activité de phagocytose a été suivie dans 200 µL d'hémolymphc additionnés de 10 µL de billes de 1 µm de diamètre (ratio billes/hémocytes : 700/1) avec une incubation de 2h à l'obscurité à température ambiante.
- ✓ La taille et complexité a été mesuré avec 200 µL d'hémolymphc uniquement incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante.

PCR en temps réel : expression comparative

Protocole à mettre en œuvre avec vérification de NoRT.

La NoRT se fait avec des ARN dilués et dans les conditions de la PCR en temps réel (Mix Réactionnel de la PCR, amorces...)

1. Synthèse de cDNA : SuperScript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN)

Voir fiche technique : INVITROGEN

Dans un tube nucléase free :

ARN	500 ng
Randoms primers 3µg/µL (dil à 400 ng/µL)	200 ng = 0,5 µL
Ou oligo (dt) ₂₀	1 µL
Ou oligo (dt) ₁₂₋₁₈	200-500 ng
dNTP 10 mM	1 µL ou 0,5 µL si 20 mM
H ₂ O nuclease-free	qsp 13 µL

- Chauffer le mélange à 65°C 5 mn
- Refroidir sur glace 1 mn

Centrifuger brièvement et ajouter

Tampon 5X First Strand	4 µL
DDT 0,1 M	1 µL
Rnase Out 40 U/µL	1 µL
SuperScript III RT 200 U/µL	1 µL
Total	7 µL

- Mélanger doucement
- Incuber à 25°C, 5 mn seulement dans le cas de l'utilisation des Randoms primers
- Incuber 60 mn à 50°C
- Inactiver en chauffant à 70°C, 15 mn
- Pour la PCR ajuster la dilution du cDNA en fonction du nombre de gènes d'intérêts (au 1/30, voir moins, à tester sur le gène de ménage)

2. Présentation du Mix réactionnel sous hotte PCR

Utiliser du matériel ultra propre avec le maximum de précaution pour éviter les contaminations

Préparer le mix sur glace : faire des triplicats par concentration

Brillant I Syber Green Master Mix*	12,5 µL
Amorce sens**	2,5 µL
Amorce anti sens**	2,5 µL
H ₂ O	2,5 µL
Total	20 µL

cDNA	5 µL
Brillant III Ultra-Fast Syber Green Master Mix*	10 µL
Amorce sens**	2 µL
Amorce anti sens**	2 µL
H ₂ O	1 µL
Total	15 µL

cDNA	5 µL
------	------

*Le choix du Mix dépend du Syber Master Mix (I ou II ou III) qui a été utilisé pour standardiser les amorces.

** La concentration dépend des amorces en fonction du résultat de la standardisation

Encadrement de stagiaire

Encadrement de Camille DELAGE, pour un stage d'une durée de trois mois sur le sujet suivant :

« Quantification d'ADN viral et expression de gènes cellulaires lors d'une infection par le virus ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) en présence de pesticides. »

Responsables de stage : Mr Pierrick MOREAU et Mr Tristan RENAULT

Résumé du rapport de stage

Depuis son introduction en France, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est touchée par des épisodes de mortalités récurrents. Mais à partir de 2008, le phénomène a pris une ampleur sans précédent touchant l'ensemble des bassins ostréicoles français. Ce phénomène implique le virus, ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Par ailleurs, des études ont montré que les pesticides avaient un impact négatif sur le système immunitaire de l'huître creuse. Dans ce contexte l'objectif principal est d'étudier les interactions entre cette espèce d'huître et le virus OsHV-1, en présence de pesticides. Dans cette optique, une expérience a été réalisée pour étudier le développement de l'infection virale après une contamination de 24h par un mélange de 14 pesticides. L'infection a été induite par injection d'une suspension virale. Ainsi, ce stage a permis d'obtenir des informations en étudiant dans un premier temps la quantification d'ADN viral. Puis, dans un second temps, en étudiant l'expression de gènes cellulaires considérés comme impliqués dans les mécanismes de défense chez l'huître creuse lors d'une infection par le virus OsHV-1 en présence de pesticides.

Titre : Étude des interactions entre infection à ostreid herpesvirus 1, immunité, autophagie et pesticides chez l'Huître creuse, *Crassostrea gigas*

Résumé : Le travail de thèse s'inscrit dans la problématique très actuelle des mortalités massives de naissain et de juvéniles d'huîtres creuses, *C. gigas*, et des questionnements autour de l'implication des pesticides dans ce phénomène. La première partie de la thèse a été consacrée à l'étude des effets de pesticides sur les capacités hématocytaires de l'huître creuse (*in vitro* et *in vivo*). L'effet immunomodulateur des xénobiotiques sélectionnés (seul ou en mélange) a été exploré principalement au travers de la cytométrie en flux. La deuxième partie de la thèse a concerné l'étude des effets d'un mélange de pesticides sélectionnés sur le virus OsHV-1 et l'infection qu'il induit chez l'huître creuse. Les effets des pesticides sur le virus lui-même ont été évalués. Les expériences réalisées non pas permis de mettre en évidence dans les conditions testées, de dégradation des particules virales en présence des polluants. D'autre part, leurs effets sur les huîtres elles-mêmes ont été explorés après traitement des animaux avec un mélange de pesticides lors d'essais de pathologie expérimentale. Il a ainsi pu être montré que des huîtres préalablement contaminées par un mélange de pesticides à des concentrations retrouvées dans l'environnement semblaient être plus sensibles à l'infection virale. La troisième partie de la thèse a concerné l'étude de l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*. La publication du génome complet de cette espèce en 2012 a ouvert de nouvelles possibilités pour étudier l'immunité innée. L'étude de l'autophagie réalisée pour la première fois chez l'huître creuse a consisté lors d'une première étape en la recherche *in silico* de gènes impliqués dans cette voie et des protéines correspondantes par western blotting. Puis, le rôle de ce processus important dans l'immunité innée a été exploré au travers d'essais de reproduction d'infections en présence ou non de modulateurs de l'autophagie. Les résultats obtenus semblent montrer que l'autophagie soit un processus important pouvant être impliqué dans les capacités de défense de l'huître creuse vis-à-vis d'infections virales et bactériennes.

Mots clés : Huître creuse, pesticides, OsHV-1, autophagie, immunité, hémocyte, pathologie

Title : Study of interactions between infection Ostreid herpesvirus 1, immunity, autophagy and pesticides in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Abstract : The thesis work is part of the very current issue on mass mortality outbreaks affecting Pacific oyster, *C. gigas*, spat and juveniles and questions about the involvement of pesticides in this phenomenon. The first part of this thesis was devoted to study the effects of pesticides on hemocyte parameters in the Pacific oyster (*in vitro* and *in vivo*). The immunomodulator effect of selected pesticides (alone or in mixture) has been explored principally through flow cytometry. The second part concerned the study of the effects of a pesticides mixture on OsHV-1 itself. No direct effects have been reported on the viral particles in presence of the pollutants. Moreover, pesticide effects on Pacific oysters were also explored through experimental pathology assays after treatment of animals with a pollutant mixture. Results showed that pesticide treated oysters appeared more susceptible to the viral infection in experimental conditions. The third part concerned the study of autophagy in the Pacific oyster, *C. gigas*. The publication of the complete genome in 2012 has opened up new possibilities for the study of innate immunity in this species. The study of autophagy for the first time in oysters consisted in a first step in the *in silico* search for genes involved in this pathway and the corresponding proteins by Western blotting. Then, the role of this important process in innate immunity has been explored through reproduction infections tests with or without modulators of autophagy. Results showed that autophagy appeared as involved in defence mechanisms against viral and bacterial infection in Pacific oysters.

Key words : Pacific oyster, pesticides, OsHV-1, autophagy, immunity, hemocyte, pathology